

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра «Общая биология и
биохимия»

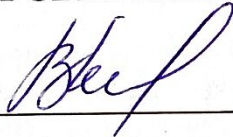
Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему

**«РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО
КОЛЛАГЕНОВОГО МАТРИКСА НА ОСНОВЕ ПОДСЛИЗИСТОЙ
ТОНКОЙ КИШКИ СВИНЬИ И ИССЛЕДОВАНИИ ЕГО СВОЙСТВ»**

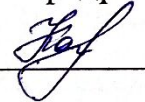
Студент  Коломыц Виктория Владимировна

Научный руководитель  Венедиктов А.А.

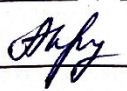
Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Рецензент  Сорокина Л.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 04.06.18 № 13)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 25.06.18 № 5)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Требования предъявляемые к внеклеточным коллагеновым матриксам.	7
1.2 Виды биоматериалов для получения внеклеточного коллагенового матрикса	8
1.3 Состав и структура внеклеточных коллагеновых матриксов.....	16
1.4 Получение внеклеточного коллагенового матрикса	18
1.4.1 Способы децеллюляризации матрикса	20
1.4.2 Гидратация.....	21
1.4.3 Лиофилизация и вакуумное прессование.....	22
1.5 Формы скаффолдов.....	23
1.6 Ответ организма на имплантацию ВКМ.....	26
1.7 Области клинического применения внеклеточного коллагенового матрикса	28
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1. Сырье для получения внеклеточного коллагенового матрикса.....	30
2.2. Этапы обработки подслизистой тонкой кишки	31
2.2.1 Предварительная обработка и отбраковка	31
2.2.2 Децеллюляризация.....	31
2.2.3 Наслаивание и стабилизация сшивающим агентом	32
2.2.4 Лиофилизация	33
2.3 Гистологический контроль обработки.....	33
2.3.1 Окраска гематоксилин-эозином	35
2.3.2 Окраска по методу Вейгерт-Ван-Гизона	35
2.4 Исследование физико-механических параметров внеклеточного коллагенового матрикса	36
2.5 Методы изучения биологических свойств внеклеточного коллагенового матрикса на культурах клеток	38

2.6 Методы оценки тканевой реакции на имплантацию внеклеточного коллагенового матрикса	41
2.7. Методы статистической обработки данных.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1 Результаты обработки подслизистой основы тонкой кишки свиньи	44
3.2 Результаты гистологического исследования образцов	47
3.3 Результаты физико-механических исследований образцов	49
3.4 Результаты исследования на культурах клеток	51
3.4.1 Изучение цитотоксичности.....	51
3.4.2 Изучение митотической активности.....	53
3.4.3 Изучение динамики численности клеточных популяций	54
3.5 Результаты оценки тканевой реакции на имплантацию	56
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	63
ВЫВОДЫ	65
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	66
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	67

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Тканевая инженерия является одним из наиболее перспективных направлений регенеративной медицины. Она направленная на создание *in vitro* эквивалентов поврежденных тканей и органов для их терапевтической реконструкции и использует принцип трансплантации клеточной культуры на биосовместимом носителе. Тканевая инженерия открывает широкие перспективы для создания эффективных биомедицинских технологий, с помощью которых становится возможным восстановление поврежденных тканей и органов.

Первые разработки по восстановлению целостности соединительных тканей можно отнести к 70-м годам XX в., когда были предприняты попытки использования собственной (аутологичной) ткани. Этот метод остается широко распространенным и на сегодняшний день, однако хорошо известны его недостатки: ограничение объема трансплантата, повреждение донорского участка, увеличение времени проведения операции и времени послеоперационной реабилитации. В настоящее время данная проблема решается производством тканеинженерных конструкций (ТИК), состоящих из подложек-носителей, называемых матриксами, матрицами или скаффолдами, и культивируемых на них клеток различных типов. Биологические скаффолды состоят из биорезорбируемых материалов, которые заселяются аутологичными клетками организма, вследствие чего с большой точностью по структурным и биомеханическим особенностям соответствуют поврежденному участку, а также не имеют иммунологического отторжения. Скаффолды способствуют восстановлению нормальной формы, архитектуры и функций различных тканей организма, а значит, перспективны для замещения дефектов внутренних органов, хрящей, тампонирования костных и других полостей, лечения кожных ран, трофических язв, ожогов и другого рода повреждений. Кроме того,

скаффолды могут быть использованы в качестве транспортного средства доставки лекарственных препаратов, таких как антибиотики, химиотерапевтические агенты или факторы роста.

Современные информативные исследования были проведены на различных видах ксеногенных скаффолдов. Однако наиболее полные данные, касающиеся механических и структурных свойств, макро - и ультраструктур и биологических свойств были зарегистрированы для подслизистой тонкой кишки свиньи (ПТК). Эта внеклеточная матрица млекопитающих представляет собой отличный материал, подходящий для различного терапевтического применения. Она является биосовместимым, нетоксичным природным полимером, при этом деградация изделий из подслизистой тонкой кишки в организме сопровождается образованием нетоксичных и, в некоторых случаях, даже полезных для регенерации продуктов, и поддается контролю.

Объектом исследования является подслизистая основа тонкого кишечника свиньи. В качестве предмета исследования в работе выступают биологические и физико-механические свойства подслизистой тонкой кишки после химико-ферментативной обработки.

Целью работы явилась разработка метода получения внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи. Также были исследованы свойства, структура и функции биологического скаффолда в условиях *in vivo*.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

- Разработать и произвести многостадийную химико-ферментативную обработку подслизистой тонкой кишки свиньи, для получения материала, отвечающего всеми свойствами биорезорбируемого внеклеточного коллагенового матрикса;
- Провести гистологический контроль образцов внеклеточного коллагенового матрикса;

- Провести физико-механическое исследование внеклеточного коллагенового матрикса по трём параметрам: модуль упругости, максимальная нагрузка и напряжение при растяжении при максимальной нагрузке;
- Изучить цитотоксическое действие, митотическую активность и динамику численности клеточных популяций полученных образцов внеклеточного коллагенового матрикса на культурах клеток;
- Провести имплантацию внеклеточного коллагенового матрикса в подкожную жировую клетчатку крыс, а также провести анализ морфологических признаков-критериев, отражающих воспалительные и репаративные процессы в операционной ране;
- Обработать полученные данные с привлечением статистических методов и провести анализ результатов.

Магистерская работа написана на 75 листах, содержит 22 рисунка, 1 таблицу и список литературы на русском и английском языках из 73 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Требования предъявляемые к внеклеточным коллагеновым матриксам

Основным условием создания скаффолдов считается наличие оптимальных биоинженерных свойств, позволяющих материалам восстанавливать повреждённые ткани и органы с эффектом имитации физиологических процессов в замещаемых биологических структурах [20].

Чтобы справляться со своей функцией (восстанавливать поврежденную ткань), скаффолд должен обладать структурой, которая работает как шаблон для роста новой ткани и ускоряет процесс регенерации. Эта структура обеспечивается сетью макропор, соединённых друг другом [7]. Способность перемещаться и проникать в матрикс, а также активировать разрастание ткани по всем направлениям заданного шаблона осуществляется благодаря взаимосвязанной сети пор [4]. Регенеративные функции матрицы непосредственно зависят от пористости и размера пор. Поры оказывают большое влияние на плотность заселения клеток в скаффолде, их локализацию, распространение и передвижение, а также значительное влияние на формирование и рост кровеносных сосудов (ангиогенез) [57]. Размеры пор и пористость сказываются и на прочностных характеристиках скаффолда. Достаточно прочная матрица обеспечивает надёжную механическую опору в зоне дефекта [21].

Важным свойством для идеальных матриксов является их способность к биodeградации [20]. Продукты разрушения материала матрикса должны представлять собой нетоксичные вещества, которые выводятся из организма или вовлекаются в естественные биохимические циклы без системного и локального накопления. Способность данных материалов встраиваться в процесс физиологического метаболизма предопределяет сбалансированность

репаративных процессов без выраженных явлений воспалительных реакций, избегая при этом развития иммунологического отторжения.

Деформативные и механические свойства имплантируемого скаффолда должны соответствовать естественной ткани реципиента. Прочность и структура рассасывающейся основы должны сохраняться до тех пор, пока не будет восстановлено достаточное количество необходимой ткани на месте дефекта [4].

Производство скаффолдов для тканевой инженерии должны соответствовать требованиям, предусмотренным международной организацией стандартов (ИСО), государственными и отраслевыми стандартами.

Таким образом, идеальный вариант скаффолда должен соответствовать следующим требованиям: отсутствие иммунологического ответа, воспалительной реакции и цитотоксичности, необходимая механическая прочность в соответствии с назначением и местом имплантации, обеспечение адгезии, пролиферации, фиксации и дифференцировки клеток, биорезорбируемость стандартными метаболическими путями. Свойства готового матрикса во многом определяются заложенными свойствами сырья для изготовления и технологией его обработки. Вследствие этого главной задачей для достижения успеха в создании действенных биоконструкций считается присутствие адекватного биodeградирующего и биосовместимого материала.

1.2 Виды биоматериалов для получения внеклеточного коллагенового матрикса

В настоящее время по всему миру проводится огромное количество трансплантационных операций с использованием как биологических, так и синтетических материалов. Коллагеновым материалам ксеногенного происхождения принадлежит важное место среди них [5]. Связано это

главным образом с хорошей обеспеченностью, удовлетворительными упруго-прочностными свойствами, хорошей биосовместимостью и биоинтеграцией, а также низкой вероятностью развития тяжелых осложнений в ранний постимплантационный период.

1. Ксеноперикардальная ткань

Перикард - тонкая тканевая оболочка, окружающая сердце в виде мешка; также перикардом покрыты прилежащие к сердцу отделы аорты, легочного ствола, устья верхней и нижней полой, легочных вен. Состоит из двух слоёв - фиброзного (наружного) и серозного (внутреннего). Фиброзный слой содержит большое количество соединительнотканых волокон (коллагеновые и эластичные), служит «каркасом» околосердечной сумки. Внутренний слой разделяется на два листка (висцеральный и париетальный), выстланных целомическим эпителием. Висцеральный покрывает внешнюю поверхность сердца, а париетальных - наружный слой перикарда. Между висцеральным и париетальным листками имеется щелевидная полость, в которой в норме содержится небольшое количество прозрачной серозной жидкости; она уменьшает трение между тканями и оказывает амортизирующее действие [22].

В настоящее время отечественные и зарубежные компании в качестве матричного материала используют телячий, свиной и конский перикарды, изготавливая из них биорезорбируемые коллагеновые мембраны для применения в стоматологии, протезы для герниопластики, а также клапаны сердца и протезы сосудов для сердечно-сосудистой хирургии: Jason membrane (Botiss), Collprotect membrane (Botiss), Heart(BIOTECK), bioPLATE MEMBRANE (Кардиоплант), Evolution (OsteoBiol), GRAFT Collagen Membrane (Alpha Bio's), Ксеноперикардальная пластина (Кардиоплант), Пластина БиоЛАБ-ПП/ПА ксеноперикардальная («НеоКор»).

2. Ксенобрюшина свиная

Брюшина представляет собой тонкую серозную оболочку, покрывающую внутреннюю поверхность брюшной стенки и расположенные

в брюшной полости внутренние органы [25]. Выделяют париетальную брюшину, покрывающую внутреннюю поверхность брюшной стенки, и висцеральную, покрывающую большую часть внутренних органов. Полость, находящаяся между листами брюшины, в нормальном состоянии характеризуется небольшим объемом. Она является системой щелевидных пространств, заполненных серозной жидкостью. При помощи данной жидкости происходит увлажнение брюшины и обеспечивается возможность движения покрытых ею органов. В основе брюшины лежит многослойная волокнистая соединительная ткань, покрытая с поверхности плоскими клетками мезотелия, придающими внешнюю гладкость и однородность [14]. Применение внеклеточного матрикса бычьей брюшины имеет большой потенциал в хирургическом лечении грыж (герниопластике) передней брюшной стенки, так как это позволяет минимизировать воспалительную реакцию в ответ на имплантацию эндопротеза, уменьшать вероятность образования спаек органов брюшной полости с имплантатом, а также снижать риск возникновения раневой инфекции [2].

3. Подслизистая тонкой кишки свиньи

Подслизистая тонкой кишки представлена рыхлой волокнистой соединительной тканью, содержащей большое количество кровеносных и лимфатических сосудов и нервных сплетений. Расположена между мышечным и слизистым слоями, обеспечивает фиксацию слизистой оболочки [8]. Поскольку подслизистая основа обладает эластичностью, это обеспечивает подвижность слизистой оболочки относительно мышечной оболочки и возможность образования круговых складок [3]. Подслизистая основа тонкой кишки является естественным кишечным образованием, обладает достаточными прочностными характеристиками [6], имеет толщину 0,05 – 0,22 мм [66]. Размер пор колеблется от 20 до 30 мкм [59], что обеспечивает нормальную диффузию кислорода для поддержания жизнедеятельности клеток. По аналогии с дермой, подслизистый слой состоит, из коллагенов различных типов (I, III, IV, VI) и эластина [66].

Гликопротеины фибринонектин и ламинин [53], опосредующие клеточную адгезию внеклеточного матрикса, также были идентифицированы в подслизистом слое. Кроме того, подслизистая основа содержит гликозаминогликаны и протеоглики [12], которые обеспечивают связывание клеток и факторов роста, разрушают секвестр ферментами матрикса, и усиливают клеточную инфильтрацию в поврежденной ткани. Подслизистая тонкой кишки включает в себя факторы роста фибробластов, трансформирующий фактор роста- $\beta 1$, и фактор роста эндотелия сосудов [54].

В настоящее время существуют несколько крупных компаний, производящих медицинские изделия внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи: CorMatrix Cardiovascular, Cook Biotech, DePuy Synthes Joint Reconstruction, Cook Medical. Все эти компании находятся в США и отличаются друг от друга выпускаемыми продуктами, имеющими разное клиническое применение. Российская компания Кардиоплант производит внеклеточную мембрану на основе экстрацеллюлярного коллагенового матрикса - bioPLATE MEMBRANE Matrix. Мембрана обеспечивает активную адгезию, пролиферацию, миграцию и связывание клеток, а также регуляцию фибриллярной структуры коллагена и активный ангиогенез. Используется в стоматологии при заживлении пародонтальных дефектов, для аугментации мягких тканей, закрытия рецессии, увеличения объема кератинизированной десны.

4. Мочевой пузырь свиньи

Мочевой пузырь - полый мышечный орган плоско-округлой формы, располагающийся в полости малого таза [23]. Внеклеточный матрикс, выделяемый из мочевого пузыря свиней, уже в течение многих лет используют как основу медицинских продуктов, предназначенных для устранения грыж, лечения кожных язв, а также регенерации поврежденной мышечной ткани. Помещенный в зону повреждения матрикс запускал процессы привлечения стволовых клеток и клеток-предшественников, необходимых для формирования новой здоровой ткани [67].

5. Глиссонова капсула печени крупного рогатого скота

Глиссонова капсула – тонкий слой умеренно плотной соединительной ткани, окружающей печень. Снаружи капсула покрыта однослойным плоским эпителием висцерального листка брюшины. Волокна глиссоновой капсулы образуют "внутренний скелет" печени, который поддерживает ее форму [18].

По сравнению с другими биологическими материалами, (ксеноперикард, дерма) из-за меньшей толщины и одинаковых механических свойств, предлагаемый материал более пластичен, мягок, т.е. более удобен в применении. Контакт глиссоновой капсулы непосредственно с паренхимой печени определяет меньшие антигенные свойства и меньшую подверженность кальцификации [1].

Капсула печени крупного рогатого скота находит своё применение в качестве биологического материала для протезов стенок кровеносных сосудов, стенок и перегородок сердца, клапанов сердца.

6. Дерма животного происхождения

Кожный покров - надежный барьер организма от инфекций, вирусов, обезвоживания и переохлаждения, будучи поврежденным, представляет большую угрозу для здоровья человека и его нормальной жизнедеятельности. Тяжелые поражения кожного покрова, приводят к полной гибели дермы, а заживление ран происходит долго и протекает крайне болезненно. Применение бесклеточного дермального матрикса ускоряет заживление ран с меньшим количеством осложнений от инфекций и обезвоживания.

Немецкая компания Botiss biomaterials производит коллагеновую матрицу Botiss Mucoderm для регенерации мягких тканей. Она представляет собой бесклеточную коллагеновую матрицу, полученную из дермы свиньи, которая подвергается многоступенчатой очистке. Результатом обработки является трехмерная стабильная матрица, которая состоит из коллагена I и III типа с естественной структурой коллагена, которая напоминает

соединительную ткань человека. Аналогичные продукты представляют производители Osstem Implant (Россия) – SureDerm бесклеточный дермальный матрикс и OsteoBiol (Италия) - Мембрана Derma.

7. Натуральная бычья кость

Костная ткань является природным композитом и состоит из органического вещества (коллагена); минерального компонента (неорганических солей), клеточных элементов - клеток остеобластического ряда (преостеобластов, остеобластов, остеоцитов) и клеток моноцитарного ряда [23]. Известно, что серьёзные дефекты костной ткани: возрастная потеря, либо различные патологические состояния не могут быть устранены путем естественной регенерации или путем хирургического вмешательства. Для замещения дефектов костной ткани предусмотрено использование биоматериалов или их синтетических аналогов, способных либо механически выполнять функции кости, либо стимулировать процессы репарации.

Компании Botiss, Geistlich, Dentsply Friadent CeraMed, Hans Biomed и Кардиоплант производят трансплантационный материал из натуральной бычьей кости, полученный из минеральной фазы бычьей кости, которая практически идентична структуре человеческой кости в отношении поверхностной пористости и химического состава. В таком биоматериале сохраняются естественный коллаген, являющийся важнейшими структурным белком, и биологические остеоиндуктивные молекулы, обеспечивающие физиологическую костную регенерацию. Преимущество такой ткани в том, что натуральный костный заменитель более располагает к формированию нового костного материала остеобластами и другими клетками на своей поверхности.

8. Плавательный пузырь рыб

Плавательный пузырь представляет собой заполненный газом вырост передней части кишечника, основной функцией которого является обеспечение плавучести рыб. Внутренняя выстилка плавательного пузыря образована однослойным плоским эпителием, за которым следуют тонкий

слой рыхлой соединительной ткани, мышечные тяжи и сосудистый слой. [19]. Стенка воздушного пузыря имеет низкую проницаемость для газа и большая его часть не пропускает воду. Такое строение обуславливает его прочностные характеристики. Более того, иммунитет рыб имеет схожесть с иммунитетом человека. Гамма-глобулин по количественному составу почти идентичен с таковым у человека. Таким образом, свойства данного биологического материала дают возможность применять его как материал в офтальмохирургии для склероукрепляющих операций. В качестве трансплантата используют непосредственно стенку воздушного пузыря рыбы.

Сырьем для изготовления ВКМ также могут служить такие ткани как: зародышевая ткань крупного рогатого скота, конское ахиллово сухожилие, бычье сухожилие, диафрагма крупного рогатого скота.

Более полный список компаний производителей и биоматериалов, использующихся для создания скаффолдов, представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Компании использующие коммерчески доступные биоматериалы для производства скаффолдов

Наименование изделия	Производитель, страна	Материал изготовления
Biocollagen	Bioteck (Италия)	Ахиллово сухожилие конское
Duradapt	Pegasus Biologicals (США)	Лошадиный перикард
Durasis	Cook SIS (США)	Свиной тонкий кишечник
Durepair	TEI Biosciences (США)	Кожа абортированных телят
MatriStem	ACell, Inc (США)	Свиной мочевого пузырь
Oasis	Healthpoint (США)	Свиной тонкий кишечник

Продолжение таблицы 1

Наименование изделия	Производитель, страна	Материал изготовления
Pelvicol	Tissue Science Laboratories (Великобритания)	Свиная дерма
Stratasis	Cook SIS (США)	Свиной тонкий кишечник
PriMatrix	TEI Biosciences (США)	Кожа абортированных телят
Vascu-Guard	Synovis Surgical (США)	Телячий перикард
Veritas	Synovis Surgical (США)	Телячий перикард
Xenform	TEI Biosciences (США)	Кожа абортированных телят
Bioteck heart	Bioteck (Италия)	Перикард телячий
Bio-gen	Bioteck (Италия)	Бычья кость
Bio-gen putty	Bioteck (Италия)	Конская кость
Bio-gen - гранулы	Bioteck (Италия)	Конская кость
Bio-gide	Geistlich Pharma AG (Швейцария)	Свиной перикард
Bio-oss spongiosa	Geistlich Pharma AG (Швейцария)	Бычья кость
Bio-gide perio	Geistlich Pharma AG (Швейцария)	Свиной коллаген I и III типа
Bio-oss collagen	Geistlich Pharma AG (Швейцария)	Гранулы Bio-Oss Spongiosa + свиной коллаген
Mucograft	Geistlich Pharma AG (Швейцария)	Свиной коллаген
Cerabon	Botiss (Германия)	Бычья кость
Jason мембрана	Botiss (Германия)	Свиной перикард
Collprotect membrane	Botiss (Германия)	Свиная дерма
Mucoderm	Botiss (Германия)	Свиная дерма
Jason губка	Botiss (Германия)	Бычий перикард
Apatos cortical	OsteoBiol (Италия)	Свиная кость
Apatos mix	OsteoBiol (Италия)	Свиная, конская кость
Evolution	OsteoBiol (Италия)	Свиной, конский перикард
Putty	OsteoBiol (Италия)	Свиная кость

Окончание таблицы 1

Derma	OsteoBiol (Италия)	Свиная дерма
Duo-teck	OsteoBiol (Италия)	Конский коллаген
Sp-block	OsteoBiol (Италия)	Конская губчатая кость
Rtm collagen	Cytoplast (Россия)	Бычье сухожилие
Osseoguard	Biomet 3i (США)	Бычий коллаген
Endobon xenograft granules	Biomet 3i (США)	Бычий гидроксиапатит
Bioplate barrier	Кардиоплант (Россия)	Перикард телячий
Bioplate matrix	Кардиоплант (Россия)	Свиной тонкий кишечник
Bioost cube collagen	Кардиоплант (Россия)	Бычья кость
Bioost xenograft collagen	Кардиоплант (Россия)	Бычья кость
Bioost muco plast	Кардиоплант (Россия)	Бычья кость
Остеодент-к	Русимплант (Россия)	Бычий коллаген
Остеодент-барьер	Русимплант (Россия)	Бычья дерма
Остеодент барьер plus	Русимплант (Россия)	Бычья дерма
4bone-rem	MIS (Израиль)	Свиная дерма
Biovin	OtMedical (Германия)	Свиной коллаген
Bego collagen membrane	Bego (Германия)	Свиной перикард
Биоплант	Юником (Россия)	Бычий перикард, оболочка диафрагмы

Согласно данным в таблице в мире проводятся многочисленные научные исследования по разработке способов получения ацеллюлярных биологических скаффолдов для использования в тканевой инженерии и реконструктивной хирургии.

1.3 Состав и структура внеклеточных коллагеновых матриц

Скаффолды ВКМ состоят из структурных и функциональных молекул, секретируемых клетками каждой ткани и органов из которой они состоят. Поэтому конкретный состав и распределение компонентов ВКМ будут варьироваться в зависимости от источника ткани [29]. Скаффолд состоит из

фибриллярных белков (преимущественно коллаген I типа и эластин), которые обеспечивают упругую и прочную пространственную архитектуру. В небольшом количестве присутствуют коллаген III, IV, V и VI типов [33]. ВКМ содержит множество гликозаминогликанов (ГАГ) таких как: гепарин, гепарансульфат, хондроитин-сульфат А и гиалуроновая кислота [35]. Они уменьшают воспаление и обеспечивают связывание и прикрепление клеток. Однако, количество ГАГ, оставшихся в ткани после удаления клеток, сильно зависит от метода удаления (при использовании ионных детергентов) [43]. Молекулы фибронектина и ламинина способствуют миграции клеток, адгезии и пролиферации [35, 49]. Декорин и гепаран-сульфат предотвращают образование рубцовой ткани, регулируют синтез коллагена, стимулируют ангиогенез.

Различные факторы роста, относящиеся к сигнальным белкам, также присутствуют в ВКМ, включая трансформирующий фактор роста β (TGF- β), фактор роста фибробластов (FGF-b), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [50]. Некоторые из этих факторов роста показали, что они сохраняют свою биологическую активность даже после терминальной стерилизации и долгосрочном хранении [41, 48]. Таким образом, биологические каркасы, состоящие из внеклеточной матрицы, имеют сложный состав с разнообразными молекулами которые идеально подходят для поддержки клеточных процессов, необходимых для оптимальной функции ткани и органа.

Архитектура коллагенового волокна ВКМ - скаффолда играет решающую роль в определении его биомеханического поведения. Выравнивание и организация коллагенового волокна зависят от функции исходной ткани, из которого получен ВКМ. Так, например, подслизистая тонкой кишки имеет характерное коллагеновое волокно, которое связано с её природной функций в организме. Выравнивание коллагенового волокна скаффолда и методы для изменения выравнивания коллагеновых волокон во время обработки также могут использоваться в качестве конструктивных

соображений для разработки скаффолдов с требуемыми механическими свойствами.

1.4 Получение внеклеточного коллагенового матрикса

Главной целью применения любого метода обработки биоматериала является удаление всех клеточных элементов, водорастворимых белков и концевых теллопептидов коллагена из нативной ткани, и максимальное сохранение структуры белков коллагена и эластина без нарушения тинкториальных свойств и последующей стабилизирующей обработки биоматериала [5].

Основной задачей модифицирующей обработки является создание матрицы с рядом свойств, таких как:

- иммунологическая толерантность;
- сохраненная структура коллагеновых и эластиновых волокон;
- плотная поперечная сшивка коллагена;
- имплантация пациентам без ограничений по возрасту;
- высокая гемосовместимость при кратковременном и длительном контакте с кровью;
- хорошее прилегание и моделирование в месте имплантации;
- высокая способность к адгезии;
- устойчивость к инфекционным поражениям.

Коллагеновые скаффолды могут быть получены разными способами: путем децеллюляризации коллагенсодержащих тканей и из раствора коллагена [26].

1. Децеллюляризация (ДЦЛ) - процедура обработки тканей, обеспечивающая разрушение клеточных элементов при поддержании в максимально сохранном состоянии внеклеточного матрикса [37, 60]. Использование ДЦЛ тканей в качестве скаффолдов основано на том, что белки внеклеточного матрикса, в отличие от клеток, несут незначительное количество антигенов, инициирующих реакцию отторжения трансплантата в

силу молекулярного эволюционного консерватизма, но при этом обеспечивают для культивируемых клеток наиболее биохимически и функционально адекватное микроокружение [26]. ДЦЛ проводится химическими, физическими и ферментативными способами, либо с помощью комбинации нескольких методов.

Первая группа методов является часто используемыми для разрушения клеточной мембраны. К ним относятся ультразвуковая обработка, механические воздействия, попеременное замораживание и оттаивание. Содержимое клеток высвобождения и облегчается последующее промывание и удаление остатков клеточных элементов из ВКМ. Однако данные общепринятые методы оказываются недостаточным для достижения полного удаления, так как большинство, если не все, материалы для скаффолдов ВКМ сохраняют некоторые ДНК [40, 45].

Процесс химической децеллюляризации делится на два этапа. Главной задачей первого этапа является деградация нуклеиновых кислот и мембранных структур, второй этап заключается в их удалении с помощью комбинаций детергентов [69]. Чаще применяют анионные детергенты (додецилсульфат натрия), цвиттерионные детергенты (дезоксихолат натрия), неионные детергенты (Тритон X-100), протеолитические ферменты (трипсин) и др. [16].

В процессе децеллюляризации возможно изменение следующих параметров: вида используемого детергента, последовательность этапов в ходе удаления клеток и длительность экспозиции в химических растворах [15]. Изменения обработки сказываются на морфологии скаффолда, увеличивая пористость биоматериала или вызывая коллапс структур и деградацию.

2. Другой подход заключается в растворении коллагена различного происхождения с последующей реконструкцией фибриллярной структуры из раствора.

Для растворения коллагена тканей используются химические и ферментативные методы, разрушающие межмолекулярные связи. Растворенный коллаген может образовывать комплексы с другими компонентами межклеточного матрикса - хондроитинсульфатом, гиалуроновой кислотой, эластином, а также с хитозаном, гепарином, антибиотиками и различными биологически активными веществами, стимулирующими регенерацию [26].

На начальных этапах обработки биоматериал, из которого изготавливается ВКМ-каркас механически или физически отделяют от нежелательных тканевых структур, далее - удаляют клетки, дезинфицируют, обезвоживают или лиофилизируют. Каждая из этих этапов обработки может нарушать целостность и архитектуру матрицы, что в свою очередь, влияет на механические и материальные свойства ВКМ.

1.4.1 Способы децеллюляризации матрикса

1. Додецилсульфат натрия (SDS) ранее применялся во многих исследованиях в качестве эффективного реагента для удаления клеток в процессе обработки. Однако ряд исследований свидетельствует о дестабилизирующем действии его на матрикс. SDS влияет на тройную спираль коллагена, вызывает набухание эластина, что приводит к нарушению структуры экстрацеллюлярного матрикса [63].

2. Тритон X-100 (октилфенилполиоксиэтилен) является неионным детергентом, используемым для разрушения мембранных структур. 0,5% или 1% раствор тритона X-100 мягко солюбилизирует мембраны клеток без денатурирующей активности [16]. В ходе одних исследований были выявлены серьезных повреждения и изменения механических свойств матрикса при полной децеллюляризации [72], в ходе других, напротив, сохранение биомеханических свойств при полном удалении клеток [38, 55].

Использование комбинации детергентов тритона X-100 с SDS позволяет получить бесклеточный скаффолд, благоприятный для заселения человеческими клетками (миофибробласты, эндотелиоциты) [62].

3. Дезоксихолат натрия (SDC) – это вещество, синтезируемое в печени из первичных желчных кислот, обладает детергентным действием, участвует в расщеплении межмолекулярных связей в жирах. Активно применяется в качестве водорастворимого ионного детергента для деградации клеточных мембран [58], в том числе для получения бесклеточных скаффолдов.

4. Трипсин. Множество исследований посвящены децеллюляризации с применением трипсина. Большинство из них сообщают о значительном разрушении коллагеновых и эластиновых волокон ткани [28, 55, 62, 70]. нефибриллярных белков (гликозаминогликанов и протеогликанов), что ведет к снижению упруго-прочностных показателей и потере тургора тканями [64].

Эффективное удаление ассоциированных антигенных эпитопов с клеточными мембранами и внутриклеточными компонентами тканей и органов необходимы, чтобы свести к минимуму или избежать неблагоприятный иммунологический ответ.

1.4.2 Гидратация

Очень немногие биологические скаффолды поддерживают гидратированное состояние во время удаления клеток и стерилизации. Избежание потери воды из ВКМ может предотвратить изменения в структуре ткани, такие как коллапс коллагеновых волокон друг на друга, и формирование физических связей между молекулами ВКМ. Электронная сканирующая микроскопия мочевого пузыря в гидратированном и лиофилизированном состоянии показывает изменения структуры ткани, которые происходят после удаления воды. Биологические скаффолды, которые сохраняют свои гидратированные состояния в процессе удаления клеток и стерилизации склонны поддерживать клеточную привязанность и

клеточную инфильтрацию *in vitro* лучше, чем скаффолды, которые подвергаются обезвоживанию с последующим регидратацией [42]. Однако основным недостатком гидратированные материалы являются непрерывным высвобождением растворимых факторов роста (таких как VEGF и b-FGF) из материала.

1.4.3 Лиофилизация и вакуумное прессование

Биологические скаффолды часто обезвоживаются лиофилизацией или вакуумным прессованием до клеммы стерилизации. Лиофилизация - это процесс, с помощью которого вода удаляется из материала сублимацией при низких температурах и низком давлении. Обезвоживание позволяет сделать скаффолды более легкими в обработке и ограничивать потерю факторов роста во время хранения [29]. Хотя лиофилизация может продлить срок хранения скаффолда, создать условия не вызывающие значительных изменений, она может изменить морфологию коллагенового волокна и рост клеток на материале [42]. Лиофилизация значительно уменьшает толщину матрикса (обычно на 30%), что приводит к уплотнению морфологии волокна и уменьшению способности материала повторного поглощения того же количества воды, которое присутствовало до процесса лиофилизации [39], возможно, из-за нарушения ГАГ в ткани [44].

Альтернативный метод, используемый для обезвоживания скаффолдов, является вакуумное прессование. Процесс вакуумного прессования позволяет прессовать несколько листов ВКМ для увеличения прочности при специфическом механическом поведении, основанном на знании архитектуры коллагенового волокна. Полученный лист обеспечивает прочность во время имплантации, превышающей силу нативного давления на ткань и придает изотропию к изначально анизотропным материалам. Вакуумное прессование является эффективным методом построения различных трехмерных форм скаффолдов.

1.5 Формы скаффолдов

Матриксy делятся на две группы: имплантаты и экстракорпоральные системы. Имплантируемые матриксy в свою очередь подразделяются на закрытые и открытые системы. В основе закрытого матрикса лежит полупроницаемая микропористая мембрана, которая ограничивает взаимодействие клеток имплантата с жидкостями организма [7].

Открытые системы выполняют функцию материала для образования тканей из клеток *in vitro*, которые быстро интегрируют после имплантации с тканями реципиента.

Открытые матриксy имеют вид мембран, двухмерных пленок, трехмерных структур в виде губок с порами, гелей, плотных и пористых объемных конструкций.

1. Резорбируемые мембраны

Резорбируемая мембрана - это полностью рассасывающаяся мембрана, предназначенная для применения в челюстно-лицевой хирургии, имплантологии, пародонтологии, хирургической стоматологии и эндодонтологии для стимулирования направленной тканевой регенерации, покрытия имплантата и пародонтальной тканевой регенерации. Мембрана обеспечивает естественную длительную барьерную функцию, основанную на специфическом составе и структуре волокон коллагена. В сухом виде является белой, плотной, прочной на разрыв коллагеновой матрицей с плотной волокнистой структурой, содержащей фибриллы коллагена типа I и отдельные эластиновые волокна. Слой волокон замедляет рост гингивальных фибробластов и благоприятствует тем самым процессу пролиферации. Через коллагеновую мембрану могут проникать важные питательные вещества. Как правило, коллагеновая мембрана полностью рассасывается в течение 12 недель после имплантации.

2. Губки

Губки являются твердотельными высокопористыми системами (80–95 % пор), при этом размеры пор зависят от способа получения и условий их применения, таким образом он может варьироваться [7]: для культивирования фибробластов и гепатоцитов поры должны быть не менее 20 мкм, для восстановления дефектов кожи – 20–150 мкм, для восстановления костной ткани – 100–150 мкм.

3. Гель-форма скаффолда

Жидкая или гель-форма ВКМ может дополнительно расширить клиническое использование скаффолдов, позволяя материалу посредством минимально инвазивных методов доставляться на интересующие места имплантации. Солюбилизированный ВКМ может быть доставлен катетером или иглоуправляемыми хирургическими методами на различные по строению анатомические участки [29]. Методы обработки геля должны минимизировать или избегать шагов очистки, которые могут уничтожать активные факторы роста и низкомолекулярные пептиды, имеющиеся в нативном ВКМ, и гелевая форма сохранила бы биологическую активность. Исследования показали, что может быть получена гель-форма из подслизистой тонкой кишки свиньи, которая способна поддерживать рост и дифференциацию разнообразия клеток *in vitro*, но для получения этой гель-формы необходим агрессивный процесс очистки коллагена, который, вероятно, приведет к потере биоактивных молекул [34].

4. Коллагеновые губчатые блоки

Блоки ксеногенной кости, обеспечивают определенную структурную опору аугментированной области. Они способствуют новообразованию кости и хорошо сохраняет объем и форму, что имеет существенное значение при регенерации кости в области крупных дефектов. Содержащийся в препарате коллаген благоприятствует формированию кровяного сгустка и проникновению в аугментат клеток, строящих новые ткани.

5. Костная паста

Производится из губчатых гранул, диспергированных (тонко измельчённых) в коллагене. Костные гранулы, из которых изготавливается паста проходят физико-химический процесс ферментной деантигенизации и последующей полной деминерализации костной матрицы посредством гидролиза солей кальция в кислой среде. Происходящее затем полное выделение коллагена позволяет получить деминерализованную костную матрицу, которая способна стимулировать формирование костной ткани. Костный коллаген в своей природной конфигурации помимо всего прочего выполняет функцию коактиватора эндогенных факторов роста и субстрата для клеточной адгезии остеобластов, способствуя, таким образом, формированию физиологической среды, благоприятной для костной регенерации в биологическом отношении.

6. Порошковые скаффолды

Лиофилизированные пластины ВКМ могут быть измельчены в порошок. Форма частицы допускает доставку ВКМ в виде инъекций. Частицы, присутствующие в измельченном ВКМ, сохраняют ультраструктурные и трехмерные характеристики поверхности исходного материала [29]. Размеры частиц от 50 до 200 мкм в диаметре. Порошковые формы ВКМ скаффолда могут использоваться в сочетании с синтетическими полимерами для создания гибридных скаффолдов.

7. Гибридные скаффолды

Скаффолды по своей природе ограничены свойствами ткани, из которой они получены, включая форму, механические свойства и диффузию кислорода. Материальные свойства скаффолдов также могут зависеть от производственных процессов (механических или химических методов удаления клеток) и от возраста и состояния здоровья животного, из которого ВКМ изготавливаются. Существуют способы, с помощью которых механическими свойствами скаффолдов возможно манипулировать, чтобы адаптировать функциональные свойства устройства для конкретных предназначений. Например, максимальную прочность тонколистовых форм

ВКМ, например, подслизистой тонкой кишки, можно увеличить, создав многослойную конструкцию из различного количества слоев [36, 73]. Механическая прочность также может быть увеличена путем сшивания структурных компонентов скаффолда с химикатами, такими как глутаровый альдегид, карбодиимид и гексаметилендиизоцианата [61], или нехимическими методами. Однако сшивание уменьшает скорость деградации *in vivo* и может изменять ответ ткани хозяина от противовоспалительного на воспалительный [30, 31, 68]. Синтетические скаффолды являются альтернативой естественным. Однако синтетические материалы обладают неадекватной активностью и часто приводят к фиброзной инкапсуляции после размещения *in vivo*. Сочетание синтетического материала с ВКМ поможет в расширении механических и материальных свойств обоих типов материалов. По аналогии, сочетание синтетических и природных материалов могут проявлять недостатки обоих материалов, т.е. воспалительный ответ хозяина на многие синтетические материалы и биологическая изменчивость материала ВКМ [29].

1.6 Ответ организма на имплантацию ВКМ

Живой организм и имплантируемый материал, при установке последнего, подвержены тесному взаимовлиянию друг на друга. Характер и степень выраженности этого влияния определяется набором биолого - химических, физико - химических особенностей используемого материала, его массой и формой, а также степенью силы ответной физиолого-биохимической реакции на имплантацию, зависящей от организма хозяина [17].

Вживление в организм чужеродного объекта не всегда сопровождается биологической совместимостью, напротив может возникать ответная реакция, расцениваемая обычно как асептическое воспаление [7].

Воспаление – это сложная, комплексная, местная сосудисто-мезенхимальная реакция на повреждение ткани, возникающая как ответ на повреждение клеточных структур организма или воздействие патогенного раздражителя. Эта реакция направлена на регенерацию затронутых тканей и является защитной функцией организма. Воспалительный процесс активирует деление фибробластов, которые в свою очередь продуцируют компоненты экстрацеллюлярного матрикса, включая коллагеновые волокна. Длительность восстановительных процессов и интенсивность протекания воспаления зависят от вида имплантируемого материала, его биосовместимости [27]. Новые биоматериалы медицинского должны проходить комплекс токсикологических, цитотоксических и морфологических исследований в условиях *in vivo*.

Имплантат, подвергаясь воздействию внутренней среды организма, в свою очередь, также претерпевает различные изменения под влиянием различных биофизиологических факторов (трение, многократный изгиб, адсорбция и др.) [7].

Нормальной реакцией на инородное тело является временное развитие грануляционной ткани с последующей заменой на фиброзную [17]. Длительность процесса зависит от вида материала и скорости его разрушения, и может варьироваться от нескольких дней до нескольких лет и завершается замещением соединительной тканью, подверженной частичной или полной инволюции. По окончании данного процесса наблюдается формирование рубцовой ткани или полная регенерация исходной. В ином случае имеет место нарушение кровоснабжения и формирование плотной фиброзной капсулы, накопление токсичных веществ, возникновение опухолевых процессов, кальцификация и инфицирование.

В процессе имплантации важным свойством биоматериала является его прорастание в окружающие ткани пациента. Интегрируя, он разрушает старый образец и прорастает новой соединительной тканью. Одновременно с биоинтеграцией происходит процесс биodeградации. По скорости

биодegradации можно косвенно судить о поведении материала при воспалительном процессе.

1.7 Области клинического применения внеклеточного коллагенового матрикса

На сегодняшний день внеклеточный коллагеновый матрикс находит все большее применение в медицине. Можно выделить следующие направления применения:

Сердечно-сосудистая хирургия

ВКМ на основе ксеноперикарда уже несколько десятилетий активно используется в хирургии сердца и сосудов. Материал используется для протезирования и реконструкции сосудов и клапанов сердца, закрытия дефектов межпредсердной и межжелудочковой перегородок, пластики околосердечных тканей, профилактики формирования спаек в средостении [5, 11, 24].

Матрикс на основе глиссоновой капсулы печени применяется для протезирования кровеносных сосудов, закрытия дефектов перегородок сердца и реконструкции клапанов.

Герниопластика

В данной области применяются протезы матрикса паховой грыжи из ксеноперикарда, подслизистой тонкой кишки, мочевого пузыря. Скаффолды помогают при хирургии грыж брюшной стенки, хирургии диафрагмальных грыж, лечении перитонита (использование ксеноперикарда для закрытия лапаростомной раны), реконструктивно-восстановительная хирургия внепеченочных желчных путей, укрытие паренхиматозных органов при резекции.

Комплексная матрица выполняет функцию естественной подложки для ремоделирования ткани хозяина, до того момента пока она не будет полностью замещена зрелой, вновь образованной тканью.

Ортопедия и травматология

Материалы на основе ксеноперикарда применяются при протезировании сухожилий, укреплении связочного аппарата суставов.

Костые матриксы (кортикальные пластины, губчатые блоки) применяются для восполнения дефектов костной ткани, лечения замедленной консолидации, ложных суставов, проведения спондилодеза.

Урология и гинекология

Возможно применение скаффолда на основе ксеноперикарда при пластике мочевыводящих путей, укреплении мышц тазового дна, урослингах и гинекологических слингах, закрытии культи почки.

Стоматология

Матриксы на основе ксеноперикарда, подслизистой тонкой кишки, ксенобоюшины, костей КРС применяются в челюстно-лицевой хирургии, хирургической стоматологии, имплантологии и пародонтологии для восполнения дефектов и регенерации костной ткани, мягких тканей, слизистой различной этиологии и локализации, при заживлении пародонтальных дефектов, закрытия рецессии, увеличения объема кератинизированной десны.

Нейрохирургия

В нейрохирургии применение матриксов было обнаружено в следующих случаях: регенерация периферических нервов (перикард), лечение деформации дурального мешка (перикард), пластика твердой мозговой оболочки.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Сырье для получения внеклеточного коллагенового матрикса

В качестве экспериментального материала были взяты образцы подслизистой основы тонкой кишки свиньи, забранной у здоровых животных с ОАО «Черкизовский мясоперерабатывающий завод» в соответствии с требованиями международных стандартов серии ISO 9001 и ISO 22442 и доставленной в лабораторию в течение не более 3 часов в изотермических контейнерах в изотонической физиологической среде. Фото сырого материала представлено на рисунке 1.



Рисунок 1. Внешний вид сырья для получения внеклеточного коллагенового матрикса до обработки

2.2. Этапы обработки подслизистой тонкой кишки

2.2.1 Предварительная обработка и отбраковка

Тонкий кишечник свиньи после доставки в лабораторию был подвержен предварительной обработке и отбраковке. Кишечник делили на фрагменты длиной около 15-20 см, разрезали в продольном направлении и аккуратно обрезали ножницами волокнистые тяжи. После этого, лоскуты материала зачищали бязевыми салфетками, тем самым удаляя остатки соединительной и жировой ткани с поверхностей. Участки с выраженными дефектами (ячеистая структура), либо лоскуты с надрывами отбраковывали. Затем лоскуты подвергались выдерживанию в течение 24 часов в гипертонической среде с возрастающей концентрацией для очистки от крови и экстракции водорастворимых белков.

2.2.2 Децеллюляризация

Обработка подслизистой тонкой кишки с целью получения внеклеточного коллагенового матрикса – многостадийный процесс. Сущность способа состоит в том, что биоткань после выдерживания в гипертонических растворах подвергается обработке протеолитическим ферментом. Концентрация протеолитического фермента влияла на 2 параметра, тесно связанных друг с другом – это разрушение либо неразрушение клеточных элементов и структурных волокон (коллагена и эластина). Для определения «рабочих» концентраций фермента провели эксперимент по обработке биоткани разными концентрациями фермента при одинаковом времени и температуре. За основу была взяты оптимальные условия действия фермента (температура, pH, концентрация), позволяющие сохранить фибриллярные белки и полностью разрушить клеточные элементы, которые после инактивации фермента и инкубации в средах с

разным осмотическим давлением удаляются из ткани вместе с водорастворимыми белками и концевыми теллопептидами коллагена, являющиеся основными носителями антигенности. При этом архитектура и тинкториальные свойства коллагена сохраняются. Более низкие концентрации не приводят к разрушению клеточных элементов, что повышает риск иммуногенности, а при более высоких концентрациях фермент начинает проявлять эластазную и коллагеназную активность и разрушает белковую матрицу.

Обработка включает в себя:

- первичную обработку растворами солей с возрастающими концентрациями для дегидратации и лизиса клеток;
- инкубацию биоматериала в растворах биологически активного компонента для разрушения клеточных элементов;
- инактивацию и нейтрализацию для прекращения действия биологически активного компонента и предотвращения разрушения архитектуры нативной ткани и сохранения структуры волокон;
- повторную обработку растворами солей с возрастающими концентрациями для полного удаления клеточных элементов.

Таким образом, децеллюляризация необходима для повышения биосовместимости материала за счет снижения его видоспецифичности. Результаты оценивали по гистологическим срезам препаратов, окрашенных гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону-Вейгерту.

2.2.3 Наслаивание и стабилизация сшивающим агентом

После химико-ферментативной обработки материала проводится наслаивание экспериментальных образцов на оргстёкла, для достижения многослойности. Были выполнены трёх- и пятислойные образцы, толщиной 0,12-0,15 мм (ВКМ 1) и 0,22-0,25 мм (ВКМ 2) соответственно. Далее образцы

высушивали в течение суток на открытом воздухе для лучшей фиксации слоёв друг с другом и подвергали структурной стабилизации сшивающим агентом также на 24 часа. Сшивки в коллагеновых тканях значительно повышают прочность за счёт образования поперечных связей и снижают скорость биорезорбции биоткани, что делает её биосовместимой и нетромбогенной при сохранении анатомической целостности, прочности и гибкости. Концентрация фиксирующего агента непосредственно определяет степень сшивания и в результате конечные свойства материала и физико-механические свойства.

В итоге, после химико-ферментативной модификации и структурной стабилизации, полученный биоматериал представляет собой биополимер из структурных белков.

2.2.4 Лиофилизация

Лиофильная сушка является конечной стадией обработки материала. Лиофилизация состоит из предварительного замораживания (не менее 6 часов) при температуре - 80°C и сублимационного высушивания (не менее 6 часов). Для лиофильного высушивания использовали специальную установку – сублиматор VACO 5-II (Zirbus), в котором в определенном режиме поддерживались два показателя - температура и давление (вакуум).

2.3 Гистологический контроль обработки

Целью гистологического исследования является подтверждение отсутствия клеточных элементов и сохранности коллагеновых и эластиновых волокон в полученном материале.

Гистологическое исследование мягких соединительных тканей состоит из следующих этапов:

- Подготовка образцов для гистологического исследования;

- Проводка фрагментов по возрастающим концентрациям спиртов и пропитка парафином с последующим изготовлением парафиновых блоков;
- Изготовление парафиновых срезов;
- Окрашивание гистологических срезов гематоксилин-эозином (обнаружение клеточных элементов) и по методу Вейгер-Ван-Гизона;
- Заключение окрашенных срезов под покровное стекло;
- Изучение срезов под микроскопом в проходящем свете.

После проведения химико-ферментативной обработки образец биоматериала помещали в 4% раствор нейтрального формалина не менее, чем на 24 ч, после чего помещали в емкость с подведенной к ней холодной водопроводной водой, не менее чем на 6 ч. После этого приступали к изготовлению парафиновых блоков. При этом извлеченные из воды фрагменты погружали в емкость с 50% раствором этилового спирта на 4-6 ч, далее в емкость с 60% раствором этилового спирта на 4-6 ч, далее в емкость с 70% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 80% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 90% раствором этилового спирта на 8-12 ч, далее в емкость с 96% раствором этилового спирта на 12-24 ч. После этого помещали образцы в хлороформ на 1,5 часа. После извлечения фрагментов из хлороформа помещали их в смесь хлороформа с парафином в термостат при температуре 37°C на 3-6 ч (соотношение 1:1). Далее пропитывали фрагменты на водяной бане парафином при температуре 57°C на протяжении 1,5 ч. Залитые фрагменты приклеивали к деревянным колодкам.

Для изготовления парафиновых срезов парафиновый блок зажимали в держателе микротом, устанавливали на микротом нож и выставляли толщину среза на 5-7 мкм. Полученный срез переносили при помощи колющих игл в чашку Петри с теплой водой (38±2)°C, далее на предметное стекло, предварительно обработанное смесью белка куриного яйца с глицерином. Высушивали стекло в термостате при температуре (38±2)°C.

Перед проведением окрашивания проводили депарафинизацию срезов в орто-ксилоле, после чего выдерживали в спиртах с нисходящими концентрациями и доводили до воды (две порции ксилола – 3-5 минут, 96° этанол – 3 минуты, 80° этанол – 3 минуты, 70° этанол – 3 минуты, дистиллированная вода – 5 минут). [13]

2.3.1 Окрашка гематоксилин-эозином

Окрашивали срезы гематоксилином 7-10 минут, после чего промывали в дистиллированной воде 5 минут. Выдерживали в 1% растворе соляной кислоты на 70% этаноле до побурения срезов. Далее промывали дистиллированной водой, а затем слабым (0,5 %) раствором аммиака до посинения срезов. После этого окрашивали водным раствором эозина в течение 1 минуты. Далее образцы трехкратно промывали в дистиллированной воде для удаления избытка эозина, однократно в 70 % растворе этанола, двухкратно в 96% этаноле для удаления воды из срезов. Экспозиция в каждой порции спирта – 2 минуты. Для просветления дважды промывали срезы в смеси расплавленного фенола и ксилола в соотношении 1:4 в течение 1 минуты. Окончательное обезвоживание срезов проводили промыванием ксилолом в течение 2 минут [13]

2.3.2 Окрашка по методу Вейгерта-Ван-Гизона

Наносили на срез 10 капель раствора йодной кислоты на 5 мин. Промывали срезы в дистиллированной воде, после чего помещали срезы в раствор Вейгерта и инкубировали 12 часов. После промывания в дистиллированной воде наносили на срез 10 капель дифференцирующего кислотного буфера на 10 минут, промывали дистиллированной водой, наносили 10 капель железного гематоксилина Вейгерта 1 и добавляли 5

капель железного гематоксилина Вейгерта 2, оставляли на 10 минут. В течение 10 минут промывали образцы в проточной воде, далее наносили на срезы 10 капель пикрофуксина по Ван-Гизону, оставляли на 7 минут. Промывали срезы в дистиллированной воде. После погружали препараты в 70% раствор этилового спирта на 10 секунд, далее в 96% раствор этилового спирта на 2 мин. Далее препараты погружали в ксилол. После их извлечения помещали на предметное стекло, наносили на окрашенный срез 2 капли пихтового бальзама с последующим укрыванием его покровным стеклом.

Полученные гистологические стекла изучали с помощью микроскопа в проходящем свете. [13]

2.4 Исследование физико-механических параметров внеклеточного коллагенового матрикса

Физико-механические свойства биоматериалов являются его важнейшими характеристиками и определяют область возможного применения.

Основными параметрами в биомеханике являются относительное (процентное) удлинение, модуль упругости, максимальное напряжение до разрушения, максимальная нагрузка.

Когда к любому твёрдому телу прикладываются силы, объект деформируется относительно своих исходных размеров. В то же самое время внутри объекта возникают внутренние силы (напряжения). Полное удлинение зависит как от исходной длины, так и от площади поперечного сечения образца. Количественной мерой, характеризующий степень деформации, испытываемой телом, является его относительная деформация - безразмерная величина, характеризующая отношение удлинения к исходной длине образца.

Модуль упругости – отношение напряжения к соответствующей относительной деформации ниже предела пропорциональности. Если

испытание производится при растяжении или сжатии, отношение напряжение/ относительная деформация определяется как модуль Юнга.

Максимальное напряжение, приводящее к разрушению, называется пределом прочности σ . Нагрузка, при которой происходит разрушение, называется максимальной нагрузкой (единицы МПа).

Изучение физико-механических характеристик образцов внеклеточного коллагенового матрикса проводилось на испытательной установке INSTRON-5944 BIO PULS. Биоматериал оценивали по трем параметрам: модуль упругости, максимальная нагрузка и напряжение при растяжении при максимальной нагрузке.

Измерения проводили на 20 образцах каждой группы, для этого вырезали полоски размером 5x30 мм, толщину определяли с помощью измерительной головки Mitutoyo Absolute с точностью до 0,01 мм не менее чем в 5 точках. Физико-механические свойства биоматериалов напрямую зависят от компонентного состава нативной ткани, используемой в качестве сырья для его получения, сохранности волокон, толщины образцов. В эксперименте участвовали следующие группы образцов: внеклеточный коллагеновый матрикс толщиной 0,12-0,15 мм (ВКМ 1), внеклеточный коллагеновый матрикс толщиной 0,22-0,25 мм (ВКМ 2), в качестве группы сравнения – ксеноперикард (КП), являющийся одним из наиболее известных и широко используемых биоматериалов для регенерации мягких тканей. Толщина ксеноперикарда 0,3-0,4 мм.

При проведении измерений на испытательной установке INSTRON-5944 BIO PULS (рисунок 2) образцы закрепляли с помощью пневматических зажимов, погружали в физиологический раствор. Расчет параметров производился автоматически.



Рисунок 2. Испытательная установка INSTRON-5944 BIO PULS

2.5 Методы изучения биологических свойств внеклеточного коллагенового матрикса на культурах клеток

В работе использовали диплоидные фибробласты человека и мезенхимальные стромальные клетки костного мозга человека. Клетки культивировали в среде alfa MEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США), 40 мкг/мл сульфата гентамицина (Sigma-Aldrich, США), при 37°C, в условия 5% содержания CO₂ в воздухе.

Культуру нормальных диплоидных фибробластов человека получали из участков кожи внутренней поверхности предплечья методом эксплантов. Эксплантат кожи размеров 5x5 мм промывали в течение нескольких минут в фосфатном буфере, содержащем 400 мкг/мл сульфата гентамицина. Ткань механически измельчали на фрагменты размером 1–2 мм², далее фрагменты прикрепляли к поверхности культуральной посуды, подсушивали на воздухе в течение 5–7 мин, затем покрывали средой alfa MEM с 10% эмбриональной

телячьей сыворотки и инкубировали при 37°C, в условиях 5% содержания CO₂ в воздухе. Смену среды около фрагментов осуществляли каждые 3–4 дня. После выхода клеток из фрагментов, клетки открепляли от поверхности культурального пластика и определяли количество клеток. В экспериментах использовали клетки 1–4 пассажей. Субкультивирование клеток проводили в среде alfa MEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл сульфата гентамицина, при 37°C, в условия 5% содержания CO₂ в воздухе.

Аспират костного мозга разводили 1:1 раствором Хенкса (Sigma-Aldrich, США), и проводили центрифугирование на градиенте Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, США), при 800 G, в течение 30 минут. Далее стерильной серологической пипеткой собирали клетки на границе раздела Histopaque-1077 - жидкость, растворяли в среде alfa MEM (1:4) и центрифугировали при 400 G, в течение 5 минут. Осадок, содержащий моноклеарные клетки, ресуспендировали в среде alfa MEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и переносили в культуральную посуду. Далее клетки инкубировали в течении 48 часов при 37°C, в условия 5% содержания CO₂ в воздухе. После этого не прикрепившиеся к культуральной посуде клетки удаляли и продолжали культивирование прикрепившихся клеток. Смену питательной среды осуществляли каждые 2–3 дня. Клетки культивировали до достижения 70-80% конфлюента. В экспериментах использовали клетки 1–4 пассажей. Субкультивирование клеток проводили в среде alfa MEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 40 мкг/мл сульфата гентамицина, при 37°C, в условия 5% содержания CO₂ в воздухе.

Динамику численности клеток (кривые роста популяций) культивируемых на образцах оценивали по прямому подсчету числа клеток открепленных с поверхности образцов. Клетки открепляли от поверхности образцов с помощью коктейля Accutase (Sigma-Aldrich, США), ресуспендировали в питательной среде L-15 (Sigma-Aldrich, США) с 1% эмбриональной телячьей сыворотки. Далее клетки окрашивали 0,4% раствором трипанового синего в течение 1 минуты. Подсчет количества

клеток осуществляли с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США).

Число митотических клеток определяли с помощью флуоресцентной микроскопии, используя прижизненное окрашивание флуоресцентным ядерным красителем Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США). Митотические клетки выявляли по распределению хроматина, характерному для профазы, метафазы, анафазы и телофазы с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (Leica, Германия). Для анализа подсчитывали не менее 500 клеток. Митотический индекс (MI) вычисляли по формуле $MI = (P+M+A+T)/N * 100\%$, где (P+M+A+T) - сумма клеток, находящихся на стадии профазы, метафазы, анафазы и телофазы, а N - общее число проанализированных клеток.

Определение количества живых и погибших клеток проводили с помощью окрашивания клеток флуоресцентными красителями кальцеином АМ (Sigma-Aldrich, США) и йодидом пропидия (Sigma-Aldrich, США). Клетки открепляли от поверхности образцов с помощью коктейля Accutase. Клетки окрашивали в среде L-15 с 1% эмбриональной телячьей сыворотки содержащей 1 мкг/мл кальцеина АМ и 2 мкг/мл йодидом пропидия, в течение 25 минут при 37°C. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с использованием проточного цитометра EPICS XL (Beckman Coulter, USA).

Результаты опытов представляли в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка ($M \pm SEM$). Опыты проводили не менее чем в трех повторах ($n \geq 3$). Статистическую значимость отличия определяли с использованием критерия Манна-Уитни.

В эксперименте участвовали следующие группы образцов: внеклеточный коллагеновый матрикс толщиной 0,22-0,25 мм, в качестве группы сравнения – ксеноперикард (КП), являющийся одним из наиболее известных и широко используемых биоматериалов для регенерации мягких тканей. Из каждой группы материалов брали образцы размером 15×20 мм по 8 шт.

2.6 Методы оценки тканевой реакции на имплантацию внеклеточного коллагенового матрикса

Использовался метод гетеротопической имплантации, который широко применяется для оценки биосовместимых свойств медицинских изделий, скоростей биоинтеграции и биodeградации материалов, изучения тканевой реакции на имплантат [9].

Исследования проводились на базе ООО «Центр доклинических исследований», г. Пенза. В эксперименте участвовало 20 самцов белых беспородных крыс в возрасте 4-5 месяцев массой 200-250 г.

Целью исследования являлось сравнительное изучение биологического действия внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи и широко применяемого биорезорбируемого коллагенового матрикса bioPLATE MEMBRANE Barrier на основе ксеноперикарда (производитель ООО «Кардиоплант»). Перед имплантацией все исследуемые образцы размером 1x1 см упаковывали в газопроницаемые пакеты и стерилизовали окисью этилена.

Перед операцией животные в течение не менее 7 дней находились в условиях вивария. Содержание животных и условия проведения экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2-2015 «Требования к обращению с животными» [10], положениям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

При проведении операции животных наркотизировали растворами золетила (6 мг/кг, Zoletil 100, Italia) и рометара (0,5 мл/кг, Rometar, Spofa, Praha). Оперативное вмешательство проводилось в стерильных условиях. С операционного поля удаляли шерсть, участок кожи в месте разреза обрабатывали антисептиком 0,05 % раствором хлоргексидина, излишки антисептика удаляли стерильными салфетками. Имплантацию образцов

экспериментальным животным осуществляли под кожу в карманы, сформированные в области межлопаточного пространства. Такая область характеризуется малой подвижностью и доступностью для самого животного, что сводит к минимуму вероятность его вмешательства в экспериментальный процесс.

Животные выводились из эксперимента путем передозировки золетилена на 7, 14, 30, 60, 90 сутки. Область имплантации иссекали, полученные ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафин. Для рутинного гистологического исследования готовили микротомные срезы толщиной 4-5 мкм, окрашивали их гематоксилином и эозином, пирюфуксином по Ван-Гизону, полученные препараты изучали с помощью светового микроскопа [65].

В качестве маркеров успешного приживания или, напротив, биодеструкции трансплантата использовали следующие морфологические показатели: изменение структуры; интенсивность и продолжительность воспалительной реакции со стороны тканей реципиента; время образования капсулы и степень ее зрелости; скорость восстановления первоначальной структуры тканей ложа реципиента. Очень важно, сохраняет ли трансплантат структурную целостность или подвергается фрагментации и резорбции. Эти факторы определяют, насколько быстрыми будут васкуляризация и смена клеточных ассоциаций с полиморфноклеточной на лимфо-макрофагальную, а затем и на фибробластическую. Тем самым определяется время и скорость формирования коллагеновых волокон капсулы, которая является барьером и связующим звеном между трансплантатом и тканями реципиента [65].

2.7. Методы статистической обработки данных

При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. А для обнаружения промахов использовался 3s-критерий. Сравнение значений каждой из подгрупп дисперсионного комплекса проводили по методике Ньюмена-Кейлса. Различия считались статистически значимыми при уровне достоверности $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты обработки подслизистой основы тонкой кишки свиньи

В ходе многоступенчатой обработки, наслаивания, стабилизации и лиофилизации подслизистой тонкой кишки свиньи мы получили внеклеточный коллагеновый матрикс (рисунок 3, 4). Он представляет собой плотную, тонкую, сухую ткань молочно-белого цвета с неоднородным рисунком в виде жилок. Субсерозная поверхность образована коллагеновыми и ретикулярными фибриллами, нитями эластина различного диаметра, в то время как субмукозная поверхность является более гладкой. Толщина одного слоя ВКМ составляет приблизительно 0,05 – 0,22 мм. Материал имеет переменную пористую структуру с порами от 20 до 30 мкм.

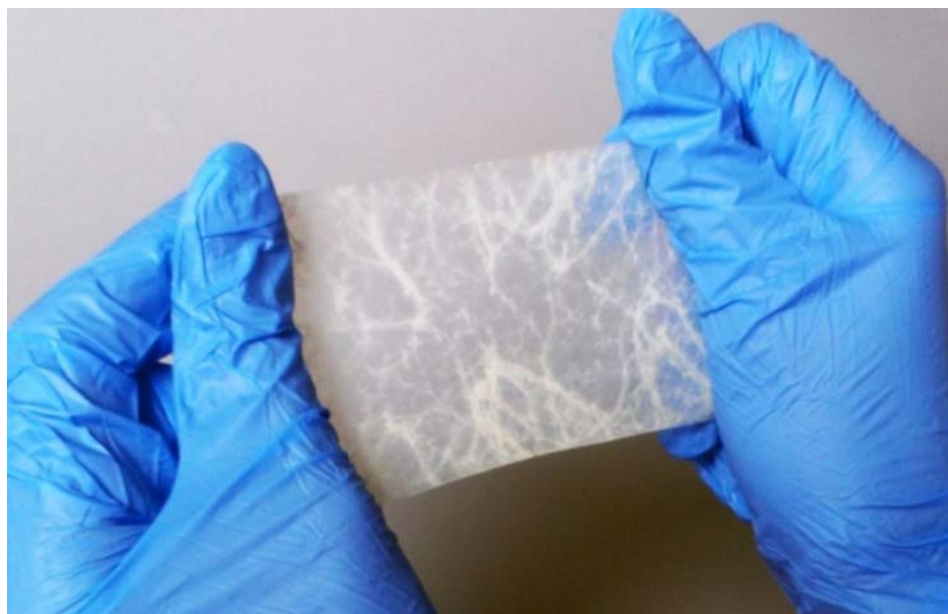


Рисунок 3. Внешний вид сырья для получения внеклеточного коллагенового матрикса после обработки (однослойный)

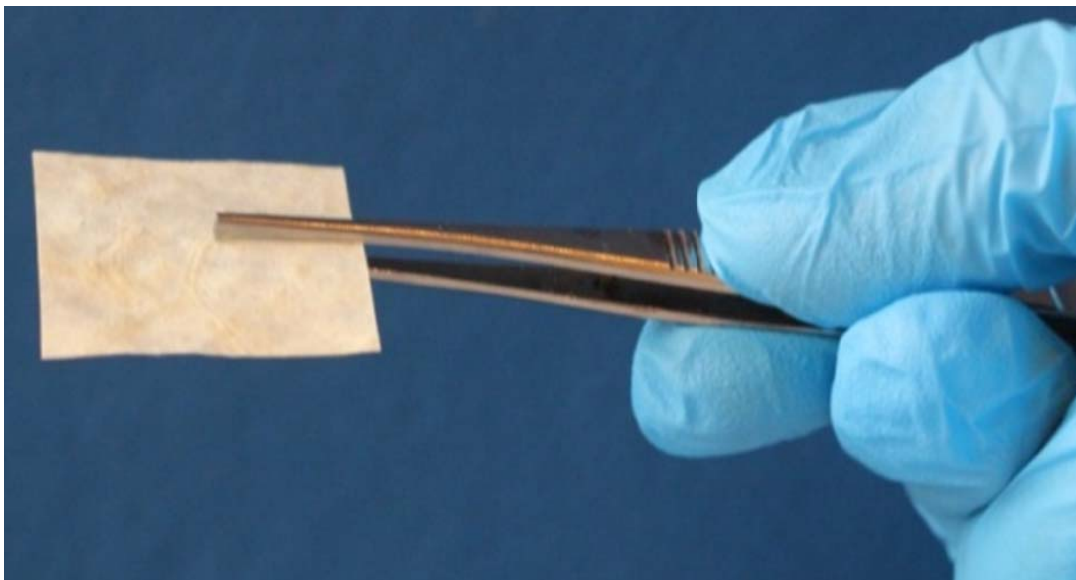


Рисунок 4. Внешний вид сырья для получения внеклеточного коллагенового матрикса после обработки (многослойный)

Пространственная архитектура биоматериала определяется содержанием в составе ВКМ нерастворимых фибриллярных белков с высокой молекулярной массой: коллагены, эластин, ламинины, фибронектины. Они обеспечивают механические свойства ткани [29, 32, 35].

Основу составляют коллагены типа I, в меньшем количестве коллагены типов III, IV, VI и эластин. Эластин организован в волокна, тесно связанные с фибриллярными коллагенами. Синтезируется в виде тропоэластина – мономерного растворимого предшественника. Эластиновые волокна нерастворимы, характеризуются высокой стабильностью, устойчивостью к ферментативной деградации и солюбилизации в водных растворах, способностью растягиваться и сжиматься в различных направлениях, сохраняя высокую прочность на разрыв, что обеспечивает эластичность ткани [29, 32, 35].

Фибронектины представляют собой димерные гликопротеины, состоящие из двух различных субъединиц, связанных между собой двумя дисульфидными мостиками С-концевыми участками. Фибронектин вовлекается в разнообразные процессы: способствует адгезии, стимулирует

пролиферацию и миграцию клеток, контролирует дифференцировку клеток, участвует в развитии воспалительных и репаративных процессов [29, 32, 35].

Ламинины представляют собой гетеротримерные гликопротеины. Ламинины автоматически собираются в сети, чередующиеся с сетью коллагена типа IV. Ламинины имеют центры специфического связывания с различными молекулами внеклеточного матрикса и клетками через интегрины. Влияют на рост, морфологию, дифференцировку, миграцию и адгезию клеток [29, 32, 35].

Гликозаминогликаны и протеоглики, такие как хондроитин-сульфат А, дерматан-сульфат, гепарин, гепаран-сульфат, гиалуроновая кислота, являются основными компонентами соединительной ткани и обеспечивают связывание клеток и факторов роста, усиливают клеточную миграцию. Гепарин и гепаран-сульфат стимулируют ангиогенез, клеточную дифференциацию и пролиферацию клеток. Дерматан-сульфат и гиалуроновая кислота регулируют пространственную структуру внеклеточного коллагенового матрикса за счет контроля размера и ориентации формирующихся новых коллагеновых фибрилл [51, 56].

Растворимые глобулярные белки факторы роста и цитокины связаны с сетью структурных белков биоматериала [56]. Они играют важную роль в общей биологической активности ВКМ, в клеточной сигнализации и ремоделировании ткани в организме реципиента.

Наличие описанных компонентов в составе биоматериала после всех этапов обработки и стерилизации определяет его основные физико-химические и биологические характеристики [47].

3.2 Результаты гистологического исследования образцов

Для подтверждения сохранности коллагено-эластиновой структуры и удаления клеточных элементов после этапа химико-ферментативной обработки материала были получены результаты гистологического исследования. Они представлены на рисунке 6.

На рисунке 5 изображена подслизистая тонкой кишки до обработки, здесь мы можем отчетливо наблюдать клеточные элементы и нативную коллагеново-эластическую структуру ткани.

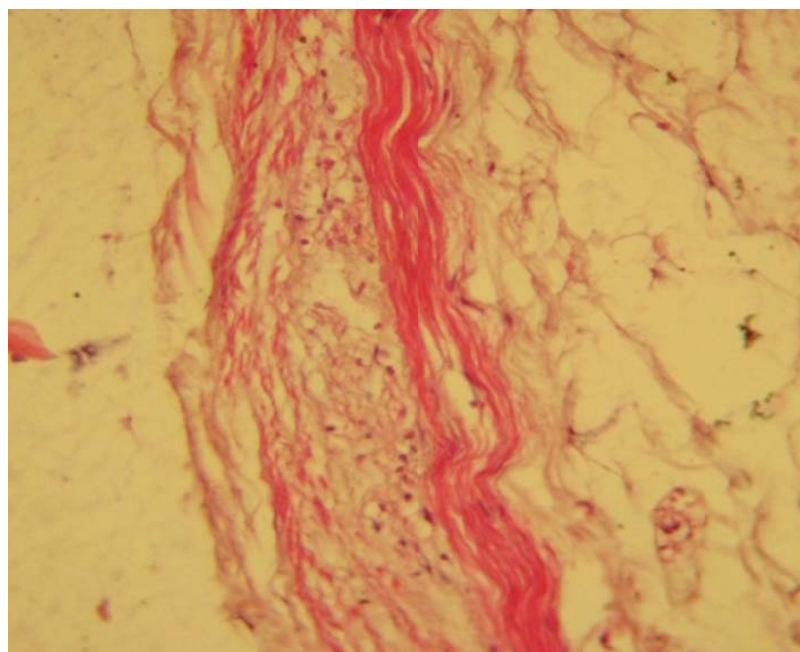
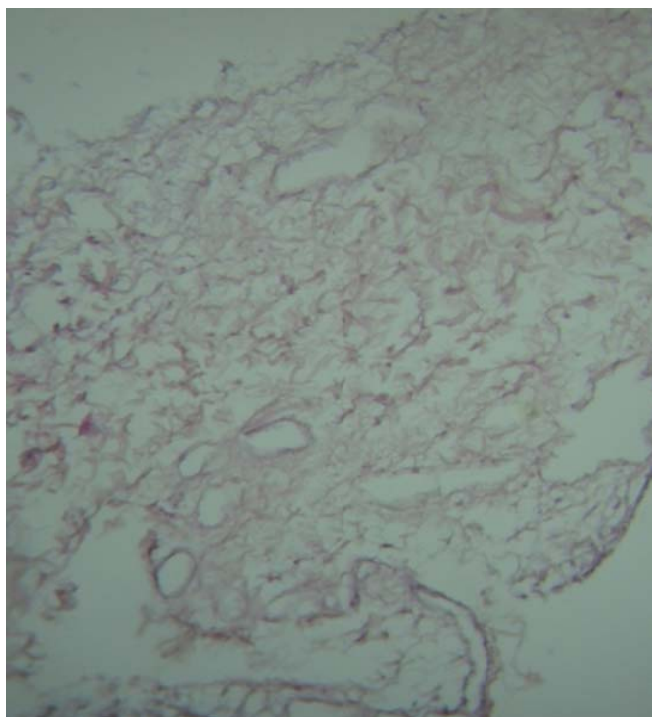
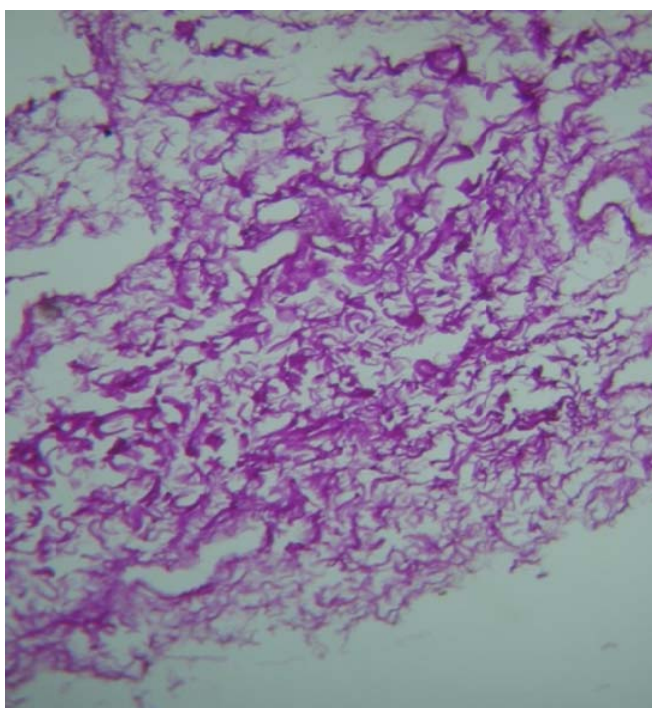


Рисунок 5. Подслизистая тонкой кишки свиньи до химико-ферментативной обработки. Окраска гематоксилин-эозин, x200.

После прохождения этапа химико-ферментативной обработки ПТК децеллюляризируется, о чем свидетельствует рисунок 6А, а коллагеново-эластическая структура ткани при этом остается сохранной, это мы можем наблюдать на рисунке 6Б.



А



Б

Рисунок 6. Подслизистая тонкой кишки свиньи после химико-ферментативной обработки. А) Окраска гематоксилин-эозин, х200. Б) Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, х200.

По полученным данным гистологического исследования, мы можем сделать вывод, что данный вид обработки материала внеклеточного является эффективным для удаления клеточных элементов с одновременным сохранением целостности волокон коллагена и эластина и материал может быть рекомендован к проведению дальнейших исследований по изучению его свойств.

3.3 Результаты физико-механических исследований образцов

Результаты, полученные при изучении физико-механических характеристик образцов биоматериалов на основе ксеноперикарда и подслизистой тонкой кишки свиньи на испытательной установке INSTRON-5944 BIO PULS, представлены на рисунках 7-9.

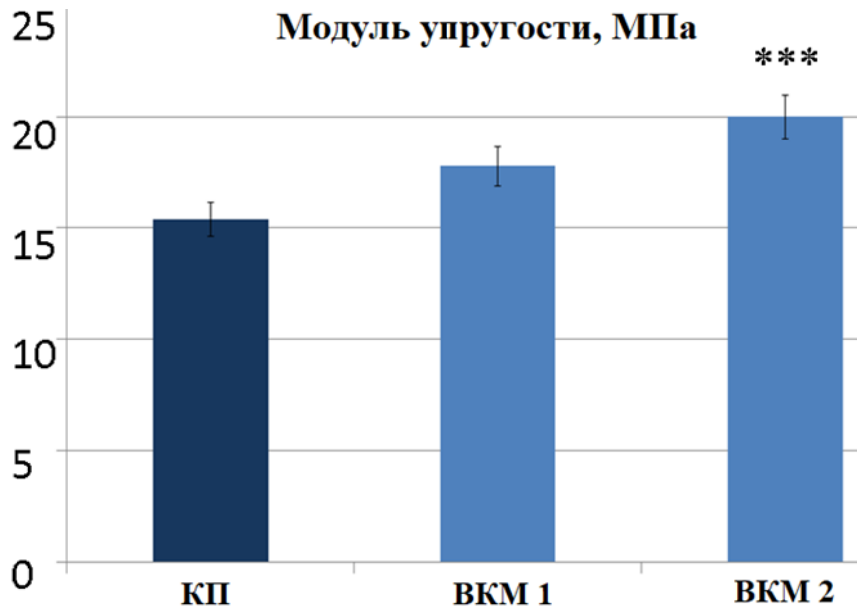


Рисунок 7. Результаты сравнительного исследования модулей упругости (МПа, $M \pm m$, $n=20$). Здесь: *** $p < 0,001$ относительно ксеноперикарда

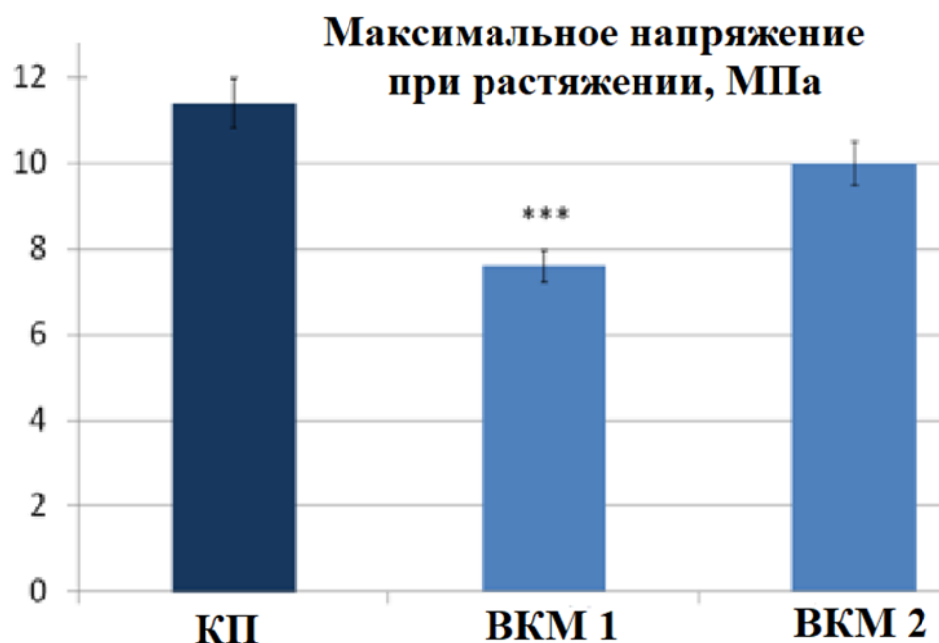


Рисунок 8. Результаты сравнительного исследования выдерживаемого напряжения при растяжении при максимальной нагрузке (МПа, $M \pm m$, $n=20$).

Здесь: *** $p < 0,001$ относительно ксеноперикарда

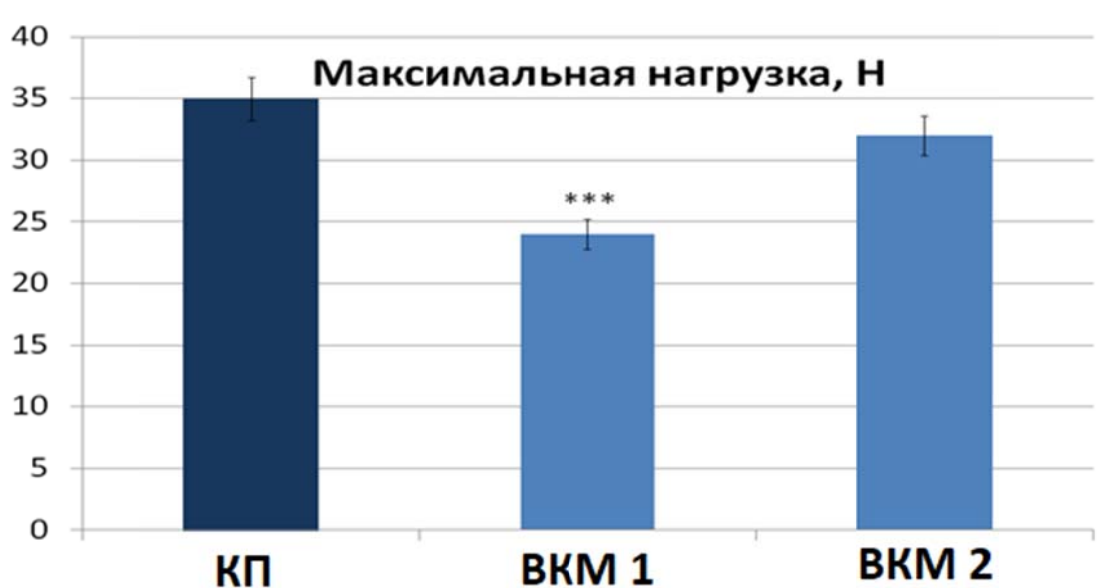


Рисунок 9. Результаты сравнительного исследования выдерживаемой максимальной нагрузки (Н, $M \pm m$, $n=20$). Здесь: *** $p < 0,001$ относительно ксеноперикарда

Отличия в физико-механических свойствах биоматериалов обусловлены разным соотношением фибриллярных белков в составе

нативной ткани, используемой в качестве сырья. Модуль упругости образцов ПТК 2 на 30% выше относительно ксеноперикарда, что можно объяснить большим содержанием эластических волокон, отвечающих за упругие свойства ткани. Значения максимального напряжения при растяжении и максимальной нагрузки для ПТК 1 достоверно ниже по сравнению с ксеноперикардом на 32% и 30% соответственно.

3.4 Результаты исследования на культурах клеток

3.4.1 Изучение цитотоксичности

Изучение цитотоксического действия образцов проводили через 24 часа и 96 часов после начала культивирования клеточных культур на экспериментальных образцах 1- на основе ксеноперикарда, 2 – на основе подслизистой тонкой кишки свиньи (рисунок 10, 11).

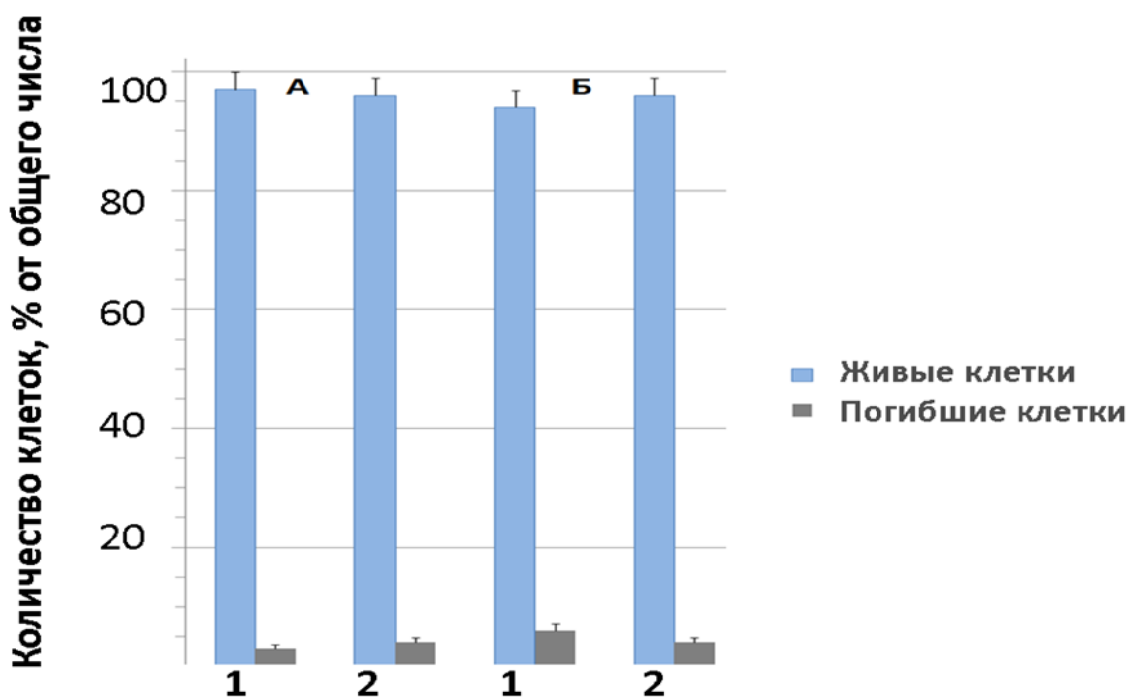


Рисунок 10. Цитотоксическое действие биоматериалов через 24 (А) и 96 (Б) часов культивирования на их поверхности диплоидных фибробластов человека

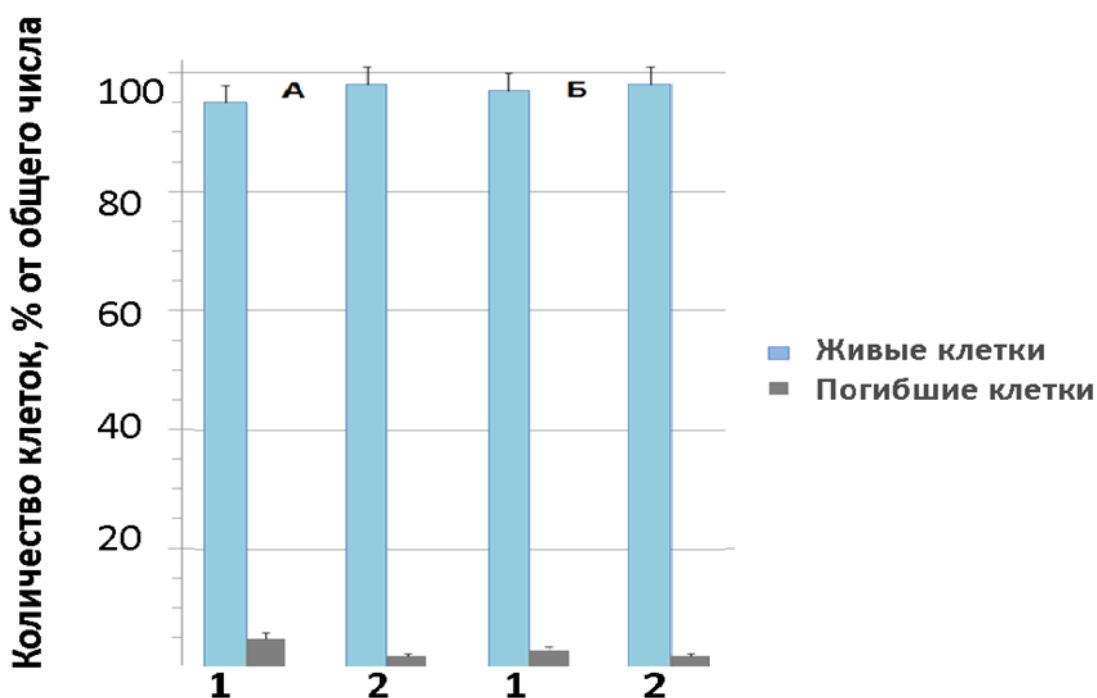


Рисунок 11. Цитотоксическое действие биоматериалов через 24 (А) и 96 (Б) часов культивирования на их поверхности мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека

На представленных результатах видно, что экспериментальные образцы биоматериалов не обладают цитотоксичностью, как через 24 часа, так и через 96 часов культивирования на их поверхности клеточных культур диплоидных фибробластов человека и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека. Количество погибших клеток при культивировании на данных образцах достоверно не отличалось от количества погибших клеток при культивировании на культуральной посуде (спонтанная клеточная гибель) и находилось в пределах 4 ± 2 % от общего числа клеток.

Полученные экспериментальные данные показывают, что образцы представленных групп нетоксичны, могут быть использованы в качестве скаффолдов для культивирования клеточных культур.

3.4.2 Изучение митотической активности

Изучение митотической активности образцов проводили через 48 часа и 72 часа после начала культивирования клеток на экспериментальных образцах 1- на основе ксеноперикарда, 2 – на основе подслизистой тонкой кишки свиньи (рисунок 12,13).

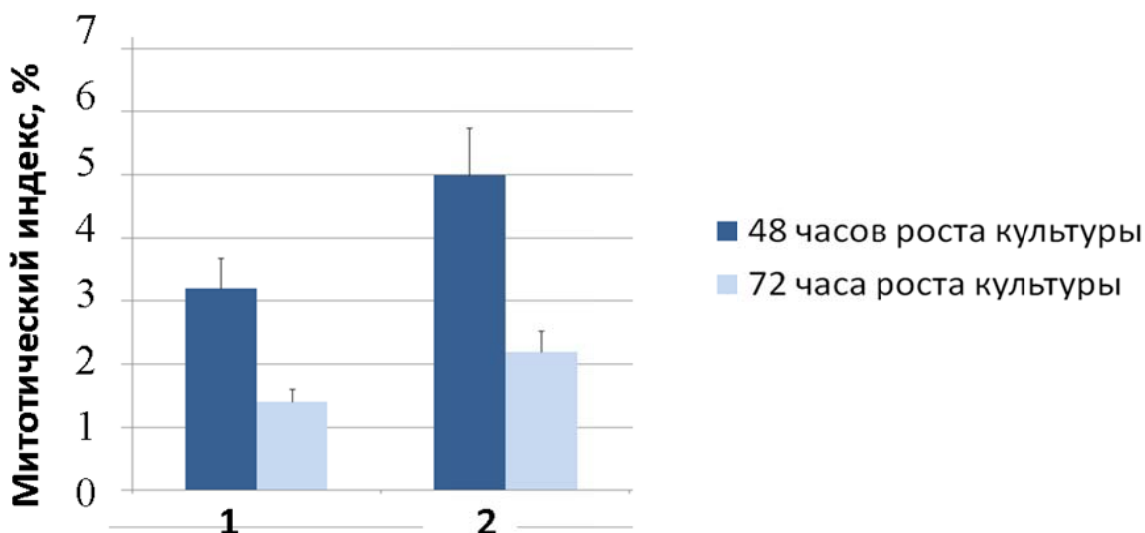


Рисунок 12. Митотическая активность диплоидных фибробластов человека через 48 и 72 часов культивирования на поверхности биоматериалов

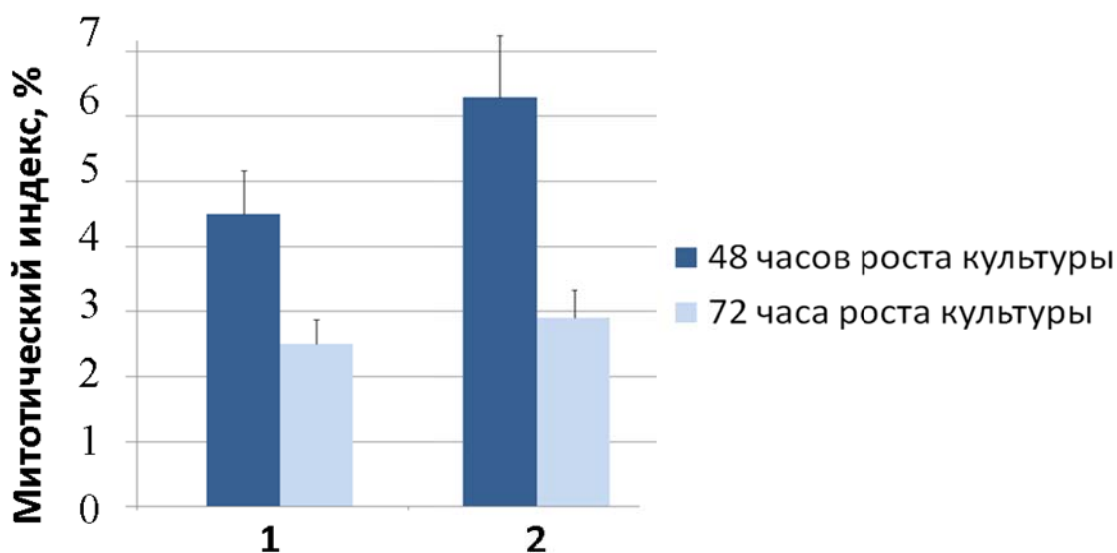
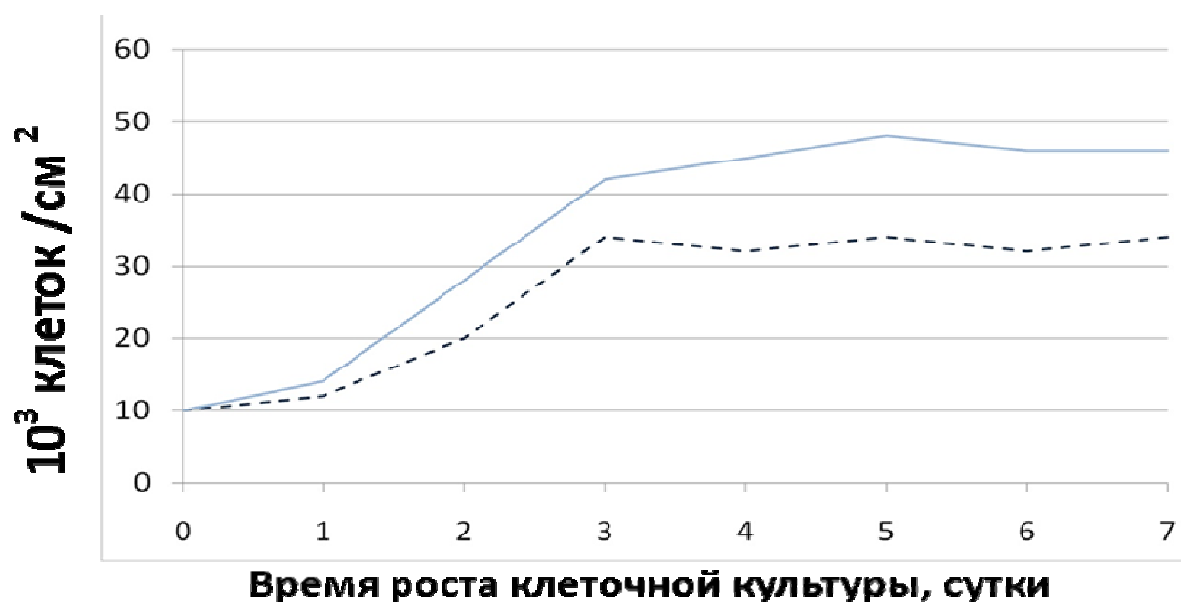


Рисунок 13. Митотическая активность мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека через 48 и 72 часов культивирования на поверхности биоматериалов

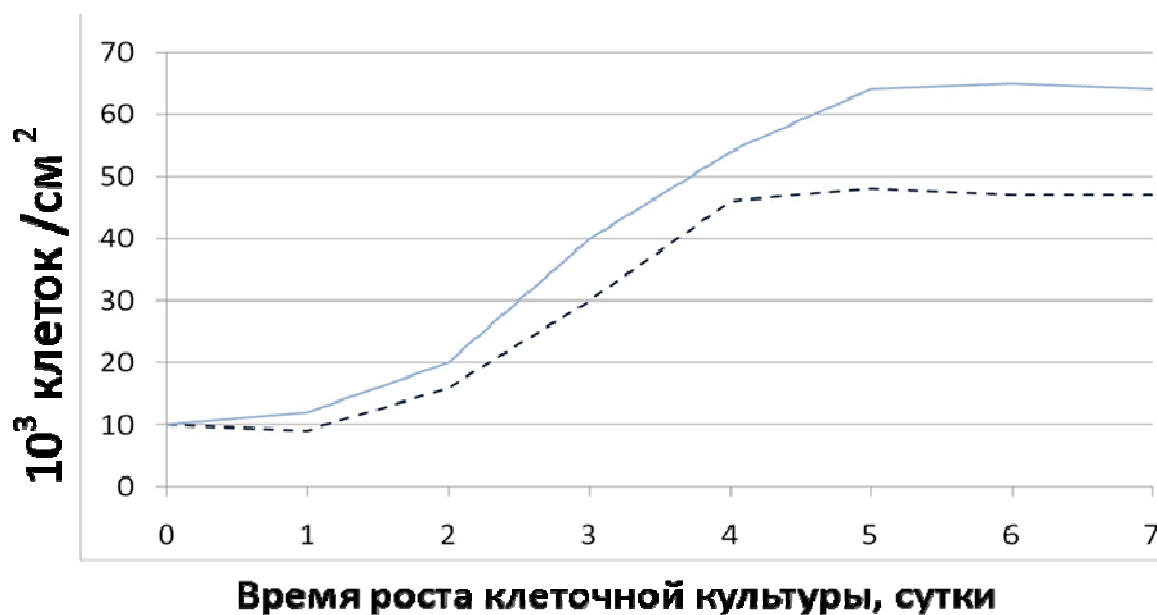
Исследование показало, что митотическая активность клеток обоих типов: диплоидных фибробластов человека и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека, культивированных на образцах внеклеточного коллагенового матрикса (группа 2) достоверно выше, чем митотическая активность тех же клеток, культивированных на образцах ксеноперикарда (группа 1). По-видимому, данный результат обусловлен наличием в составе внеклеточного коллагенового матрикса биологически активных компонентов, способствующих усилению пролиферации клеток.

3.4.3 Изучение динамики численности клеточных популяций

Изучение динамики численности клеточных популяций проводили путем регистрации количества клеток выросших на поверхности образцов биоматериалов каждые 24 часа в течение 7 суток культивирования (рисунок 14).



А



Б

- биоматериал на основе ксеноперикарда
- биоматериал на основе подслизистой тонкой кишки свиньи

Рисунок 14. Кривые роста диплоидных фибробластов человека (А) и мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека (Б) культивируемых на поверхности биоматериалов

В основу анализа положено сравнение прироста количества клеток (пролиферация клеток в культуре) при культивировании на экспериментальных образцах биоматериала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи (группа 2) с приростом клеток при культивировании на образцах биоматериала на основе ксеноперикарда (группа 1). При культивировании на образцах группы 2 прирост количества обоих типов клеток был достоверно выше ($p < 0.05$), чем прирост количества тех же клеток при культивировании на образцах группы 1.

Исследования показали, что образцы биоматериалов обеих групп не обладают цитотоксичностью, не препятствуют митотической активности и приросту количества клеток культур. Рельефность и шероховатость

поверхности материалов может определять адгезию и двигательную активность культивируемых клеток. Биоактивные факторы в их составе способствуют усилению миграции, адгезии, пролиферации [52].

Такие параметры как митотическая активность и прирост клеточных культур при культивировании на поверхности экспериментальных образцов могут быть связаны с компонентным составом образцов и способом обработки. Основными биологическими молекулами в организме, отвечающими за пролиферацию клеток являются гликопротеины и факторы роста, которые связаны с фибриллярными белками в составе материала.

Полученные материалы могут быть достаточно перспективными для применения в различных областях хирургии. В настоящее время медицина испытывает жесткую потребность в медицинских изделиях для реконструкции тканей и органов, ведутся разработки по созданию тканеинженерных конструкторов, изготавливаемых из бесклеточных матриц и последующего нанесения клеточных культур. Дальнейшим этапом изучения свойств полученных материалов является поиск его возможного применения в этой области.

3.5 Результаты оценки тканевой реакции на имплантацию

Результаты гистологического исследования образцов материалов на основе подслизистой тонкой кишки свиньи, перикарда и прилежащих тканей представлены на рисунках 15-22.

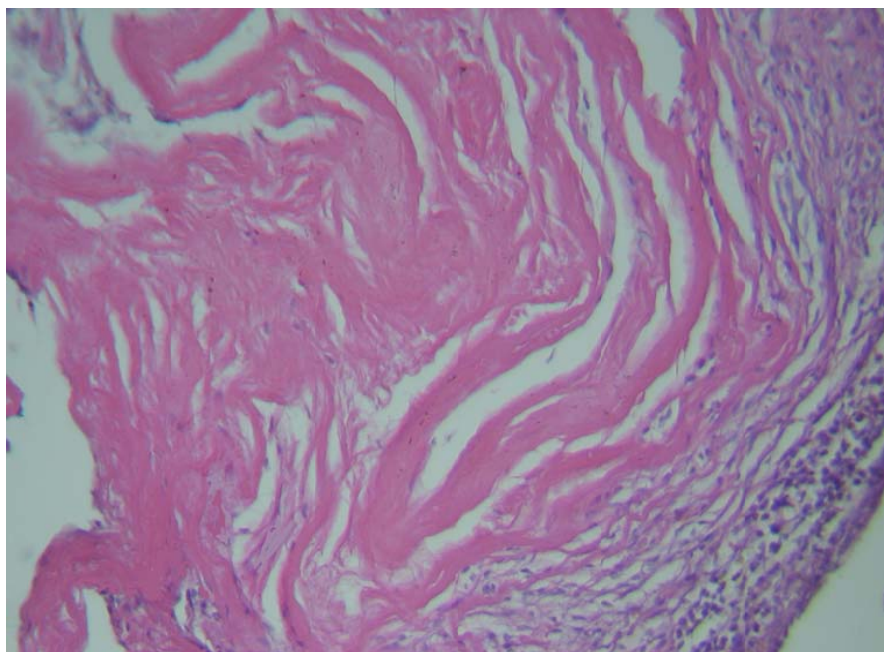


Рисунок 15. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи. Срок имплантации 7 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200

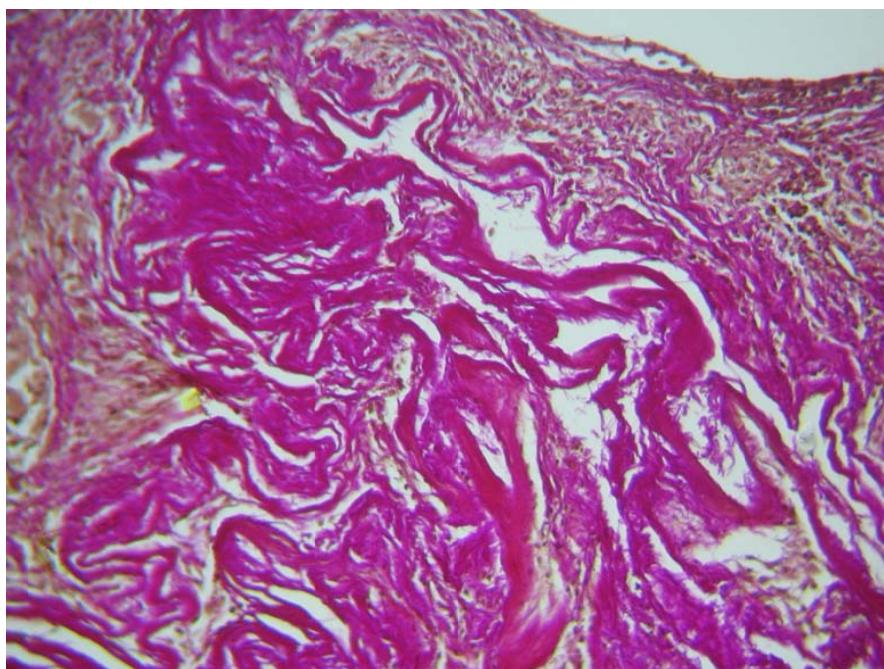


Рисунок 16. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи. Срок имплантации 7 дней. Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

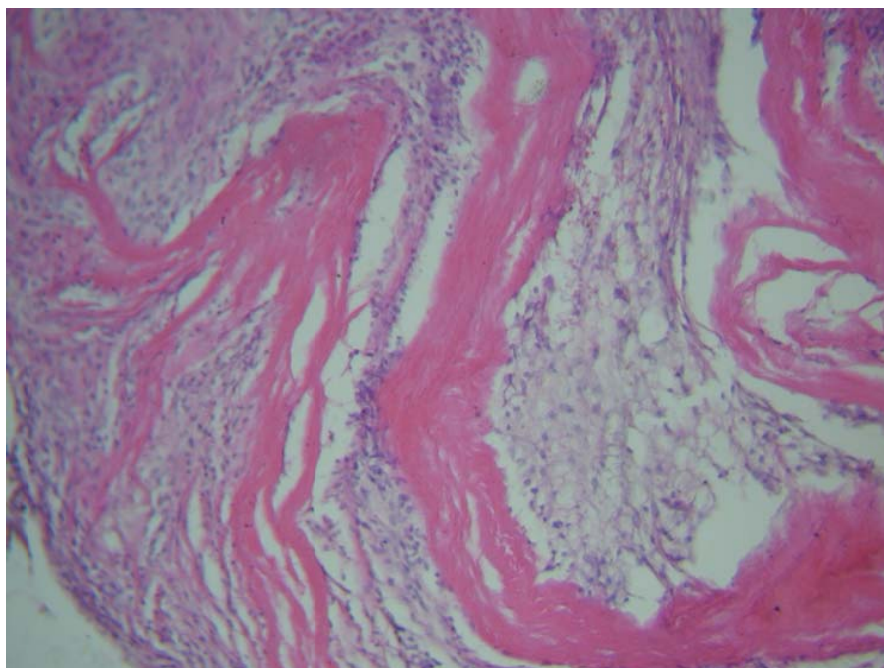


Рисунок 17. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Срок имплантации 14 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200

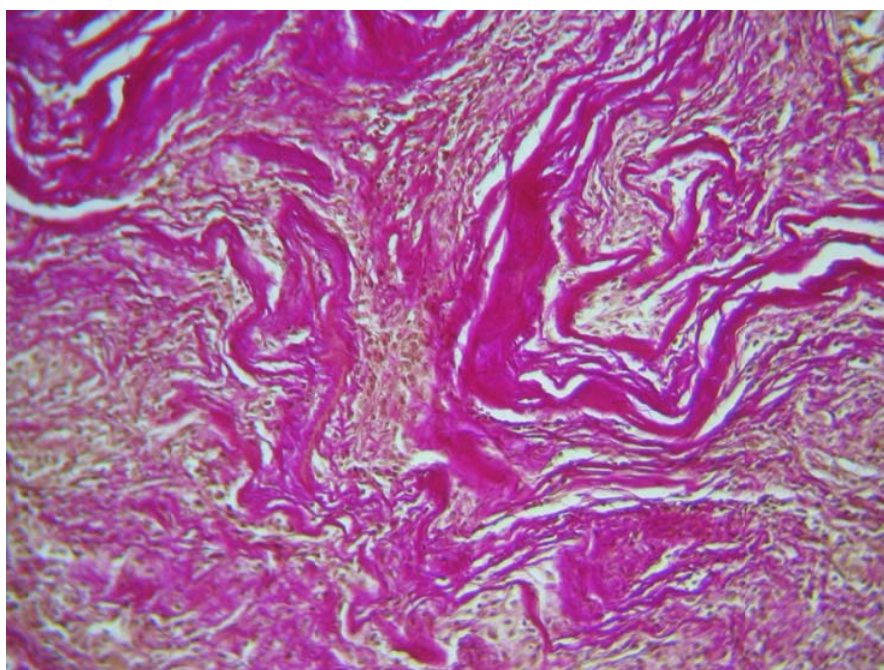


Рисунок 18. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Срок имплантации 14 дней. Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200.

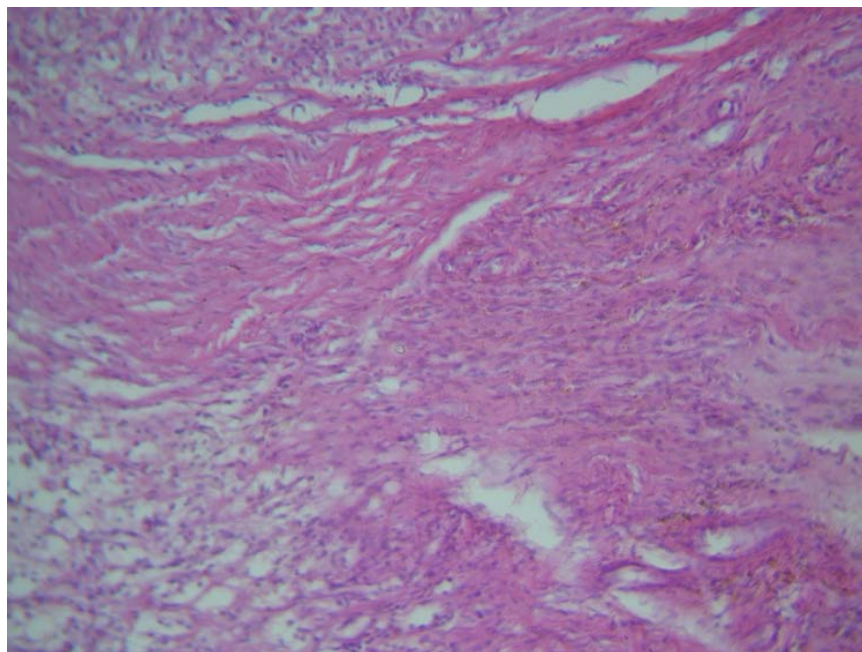


Рисунок 19. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Срок имплантации 30 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200

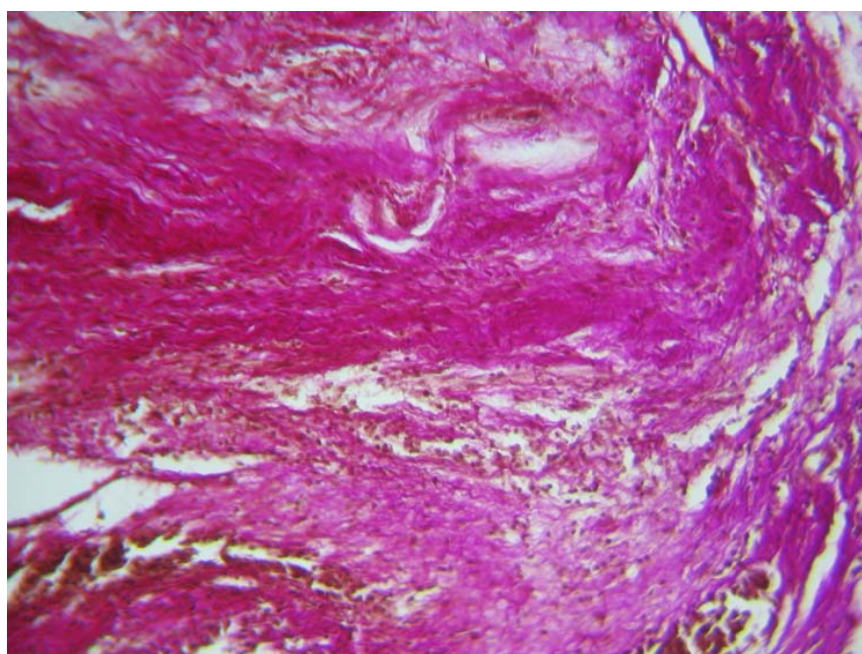


Рисунок 20. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию материала на основе подслизистой тонкой кишки свиньи.

Срок имплантации 30 дней. Окраска по Вейгерт-Ван-Гизону, x200

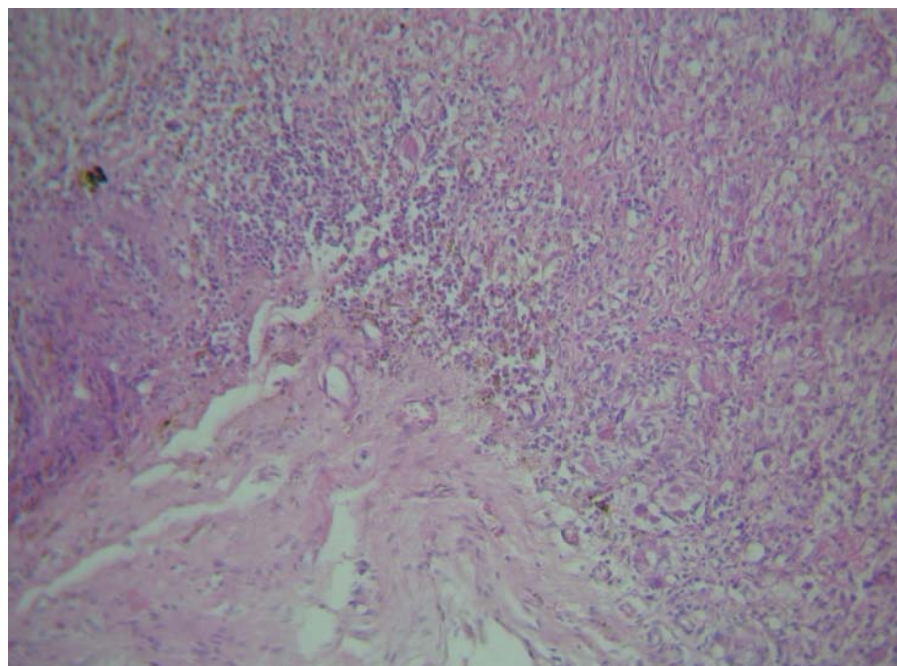


Рисунок 21. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier. Срок имплантации 30 дней. Окраска гематоксилин-эозин, x200.

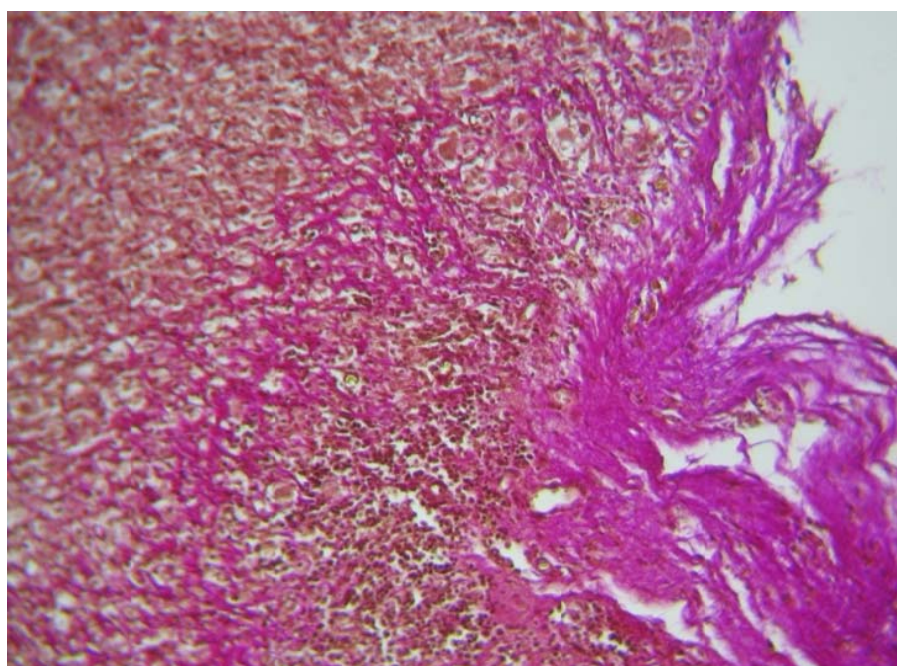


Рисунок 22. Результаты гистологического исследования тканевой реакции на имплантацию мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier. Срок имплантации 30 дней. Окраска по Вейгер-Ван-Гизону, x200.

На 7-е сутки наблюдалась тканевая реакция со стороны окружающих мембрану на основе ВКМ тканей, проявляющаяся в средне выраженной

лимфогистоцитарной инфильтрации по краю среза образца. Отмечается формирование новых коллагеновых волокон вокруг образца. Схожая картина наблюдалась при имплантации коллагеновой мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier.

На 14-е сутки в зоне имплантации мембраны на основе ВКМ обнаружена лимфогистоцитарная инфильтрация по всему образцу, фиброзирующая грануляционная ткань, содержащая фрагменты имплантированного материала, пронизанные фибробластами. Обнаружено наличие отдельных групп гигантских клеток, что свидетельствует об относительно слабой гигантоклеточной реакции при резорбции коллагена мембраны. Наблюдается множественное формирование кровеносных сосудов в грануляциях. По-видимому, резорбция образцов проходит за счет активности макрофагов и ферментативного лизиса. На 14-е сутки в зоне имплантации мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier обнаружена лимфогистоцитарная инфильтрация по краю образца, наблюдается формирование соединительнотканной капсулы вокруг имплантата.

На 30-е сутки образец мембраны на основе ВКМ замещался фиброзированной грануляционной тканью, результат свидетельствует о его активной биодеградации. В зоне имплантации мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier отмечалась активная биоинтеграция и биодеградация образца.

На 60-е сутки следов образцов мембраны на основе ВКМ не оставалось, а ткань на месте имплантации восстанавливала свою структуру. На 60-е сутки образец мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier замещался фиброзированной грануляционной тканью.

Результаты исследования показали отсутствие реакции отторжения в ответ на имплантацию мембраны на основе внеклеточного коллагенового матрикса и коллагеновой мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier. Установлено, что коллаген материалов подвергается макрофагальной резорбции и ферментативному лизису, замещаясь грануляционной, а затем

фиброзной тканью с последующей ее инволюцией. Отмечена высокая скорость биоинтеграции образцов мембраны на основе ВКМ, что может быть связано с присутствием в составе материала гликопротеинов, протеогликанов, факторов роста. Деградация материала приводит к высвобождению биоактивных молекул, что способствует усилению репаративных процессов. Срок биорезорбции мембраны на основе ВКМ составил около 1 месяца, полное восстановление структуры тканей реципиента происходило за 60 суток, в то время как полная резорбция образцов коллагеновой мембраны bioPLATE MEMBRANE Barrier и восстановление тканей реципиента происходит в течение не менее 3 месяцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени в РФ и зарубежом накоплен значительный опыт различных реконструктивно - восстановительных операций, однако проблема выбора наилучшего материала для восстановления целостности повреждённых тканей до сих пор является одной из главных.

Прогресс реконструктивной медицины напрямую связан с исследованием и освоением новых материалов; особо востребованы в настоящее время биосовместимые и высокопрочные материалы, способные к биорезорбции в живом организме без образования токсичных продуктов, изделия из которых, постепенно разрушаясь, замещаются новыми тканями, не вызывая грубых морфологических изменений. Таким образом, открытие и изучение биологических скаффолдов из ксеноматериалов явилось значимым событием. Наиболее востребованным и развивающимся на сегодняшний день направлением является разработка биоимплантатов на основе коллагенсодержащих биотканей. Одной из разновидностей подобных материалов является обработанная подслизистая основа тонкой кишки свиньи.

В ходе исследования был разработан метод, позволяющий получить внеклеточный коллагеновый матрикс на основе данного материала. Полученный материал эластичный, тонкий, полупрозрачный, но упругий, имеет толщину 0,05 – 0,22 мм, имеет переменную пористую структуру с порами от 20 до 30 мкм.

В основе технологии, применяемой для обработки подслизистой тонкой кишки, стоит процесс децеллюляризации ткани. Он основан на воздействии на ткань протеолитическим ферментом и выдерживание биоткани в растворах с разным осмотическим давлением. В результате этого материал лишается клеточных элементов и гликозаминогликанов, и, как следствие, иммуногенности. Полученный таким способом внеклеточный коллагеновый матрикс обладает умеренными показателями

биосовместимости, скорости резорбции и скорости замещения собственными тканями. Результаты исследования показывают, что изделие соответствует требованиям, предъявляемым к современным имплантатам и заслуживает внимания для дальнейшего изучения и тестирования. Исследовательские работы на различных формах клеточных культур в условиях «in vitro» выявили способность фибробластов и мезенхимально-стромальных клеток костного мозга адгезировать и пролиферировать на поверхности и в порах биорезорбируемого пластического материала, а также доказали безопасность применения биоматериалов.

В условиях экспериментальной модели была проведена имплантация и сравнительный анализ морфологических показателей биопластического материала. Показано, что пластический материал способен адгезировать к тканям раневого дефекта, формировать биологический струп, ускорять сроки регенерации, а также метаболизировать по мере эпителизации раны.

Рекомендуется проведение дальнейших исследований по изучению возможности использования полученного материала в травматологии, герниопластике (лечение паховой грыжи), кардиохирургии (восстановление перикарда и реконструкция и ремонт сердечной ткани, производство биологического чехла для CIED), нейрохирургии (регенерация периферических нервов, при деформации дурального мешка), стоматологии и пародонтологии (регенерация мягких тканей), а также для лечения ожоговых ран.

Мы надеемся, что созданный в результате настоящего исследования биологический скаффолд на основе подслизистой тонкой кишки, найдет широкое и достойное применение, а также станет еще одним шагом на пути к решению фундаментальных задач современной практической медицины.

ВЫВОДЫ

Результаты проведенной работы позволили сделать следующие выводы:

1. Разработан химико-ферментативный метод получения внеклеточного коллагенового матрикса из подслизистой тонкой кишки свиньи. Доказано, что ключевые стадии многостадийной обработки подслизистой основы тонкой кишки существенно влияют на структурные свойства биоткани;
2. По разработанной программе биологических испытаний изделий, длительно контактирующих с тканями пациента, методами «in vitro» и «in vivo» доказана биологическая безопасность биоматериала;
3. В экспериментах в условиях «in vitro» выявлена способность мультипотентных мезенхимально стромальных клеток адгезироваться и пролиферировать на поверхности и в порах биорезорбируемого пластического материала;
4. Сравнительное гистологическое изучение области имплантации ВКМ из подслизистой тонкой кишки в подкожной жировой клетчатке крыс, а также анализ морфологических признаков-критериев, отражающих дистрофические, воспалительные и репаративные процессы в операционной ране, свидетельствуют об ослаблении воспалительного процесса к 30 суткам после операции, а также заметном усилении и ускорении репаративного компонента;
5. По результатам физико-механических исследований было выявлено, что полученный материал незначительно уступает образцам из ксеноперикарда по значениям максимального напряжения при растяжении и максимальной нагрузки, но демонстрирует лучшие показатели модуля упругости, что можно объяснить большим содержанием эластических волокон.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПТК – подслизистая тонкой кишки

ВКМ – внеклеточный коллагеновый матрикс

ГАГ – гликозаминогликаны

ДЦЛ – децеллюляризация

SDS - додецилсульфат натрия

SDC - дезоксихолат натрия

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астраханцева, Т. О. Результаты использования глассоновой капсулы печени при коррекции сложных врожденных пороков сердца : автореф. дис. доктора мед. наук / Т. О. Астраханцева. – М., 2009. – 42 с.
2. Бадыров, Р. М. Результаты применения внеклеточного матрикса ксенобрюшины для реконструкции передней брюшной стенки в отдаленные сроки эксперимента / Р. М. Бадыров, Н. Т. Абатов, М. М. Тусупбекова, И. Н. Альбертон, И. К. Мусабеков // Наука и здравоохранение. – 2018. – №1. – С. 24-35
3. Билич, Г. Л. Анатомия человека / Г. Л. Билич, В. А. Крыжановский. – М.: Эксмо, 2012. – 224 с.
4. Борзенко, С. А. Обоснование выбора биополимерных материалов для конструирования 3D-матрицы искусственной роговицы / С. А. Борзенко, А. А. Желтоножко, Ю. А. Комах // Вестник офтальмологии. – 2015. – № 131 (4). – С 94-96
5. Венедиктов, А. А. Разработка метода получения внеклеточного матрикса на основе ксеноперикардальной ткани и оценка его свойств / А. А. Венедиктов, В. К. Фуки, М. Т. Генгин, О. В. Калмин, Д. В. Никишин, Л. В. Живаева // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2013. – № 4 (27). – С. 12-25.
6. Волков, А. В. Тканевая инженерия тонкой кишки / А. В. Волков // Гены и клетки. – 2005. – № 1. – С. 38-39
7. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии: электрон. учеб. пособие / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 262 с.
8. Гайворонский, И. В. Нормальная анатомия человека / И. В. Гайворонский. – СПб.: СпецЛит, 2013. – Т. 1. – 561 с.

9. ГОСТ Р ИСО 10993–11–2011 "Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия".

10. ГОСТ Р ИСО 10993–2–2011 "Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными".

11. Иванов А. С., Иванов В. А., Балоян Г. М., Евсеев Е. П., Шехтер А. Б., Милованова З. П. Ксенопластика в реконструктивной хирургии сердца и сосудов. Результаты 20-летнего использования пластических материалов на основе ксеноперикарда // Биопротезы в сердечно-сосудистой хирургии: Материалы всероссийской конференции с международным участием. – Кемерово, 2001. – С.41-43.

12. Калмин, О. В. Изучение in vivo свойств ксеноперикарда, прошедшего различную обработку химико-ферментативным методом / О. В. Калмин, Л. В. Живаева, А. А. Венедиктов, Д. В. Никишин, В. К. Фуки, М. Т. Генгин // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2013. – № 2 (26). – С. 15-26.

13. Коржевский, Д. Э. Основы гистологической техники. Практическое руководство / Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров. – Спб.: СпецЛит, 2010. – 95 с.

14. Краев, А. В. Анатомия человека / А. В. Краев, О. В. Резцов – М.: Медкнига, 2007. – Т. 1. – 496 с.

15. Купаева Д. И. Тканевая инженерия клапанов сердца: децеллюляризация алло и ксенографтов / Д. И. Купаева, А. В. Лаврешин, С. В. Анисимов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – № 1. – С. 34-39

16. Лаврешин А.В. Тканевая инженерия корня аорты человека методом децеллюляризации: Автореф. Дисс. Кан. Мед наук. – Санкт-Петербург, 2016. – 108 с.

17. Парфенов, И. П. Биосовместимость синтетических материалов, применяемых в хирургии грыж передней брюшной стенки / И. П. Парфенов, А. Л. Ярош, А. В. Солошенко // Научные ведомости. – 2010. – № 22 (93). – С. 5-13
18. Привес, М. Г. Анатомия человека / М. Г. Привес, Н. К. Лысенков, В. И. Бушкович – СПб.: СПбМАПО, 2009 – 720 с.
19. Пучков, Н. В. Физиология рыб: учеб. пособие для ин-тов / Н. В. Пучков. – Москва : Пищепромиздат, 1954. – 372 с
20. Рахматуллин, Р.Р. Биопластический материал для восстановительной и реконструктивной хирургии: дис. док-ра биол. наук. – М., 2014. – С. 11-33
21. Садовой, М.А. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы / М. А. Садовой, П. М. Ларионов, А. Г. Самохин, О. М. Рожнова // Хирургия позвоночника. – 2014. – № 2. – С. 79-86
22. Сапин, М.Р. Анатомия человека. / М. Р. Сапин, В. С. Ревазов, В. Я. Бочаров. – М.: Медицина. – 2001. – Т.1. – 640 с.
23. Синельников, Р.Д. Атлас анатомии / Р. Д. Синельников, Я.Р. Синельников, А. Я. Синельников. В 4 томах. – М.: Новая Волна, Умеренков, 2010. – 343с.
24. Столяров М. С. Клинико-функциональная оценка пластики сонных артерий заплатой из ксеноперикарда, обработанного диэпоксисоединениями, при каротидной эндартерэктомии: Автореф. дисс. кан. мед. наук. – Новосибирск, 2008. – 20 с.
25. Татаринов, В. Г. Анатомия и физиология: учебник для учащихся медсестринских отделений медицинских училищ / В. Г. Татаринов. – 4-е издание. – Москва: Медицина. – 1967. – 352 с.
26. Шехтер, А. Б. Морфология коллагеновых матриц для тканевой инженерии (биосовместимость, биodeградация, тканевая реакция) / А. Б. Шехтер, А. Е. Гуллер, Л. П. Истранов, Е. В. Истранова, Д. В. Бутнару, А. З.

Винаров, О. Л. Захаркина // Архив патологии: Научно-теоретический журнал. – 2015. – Т. 77, № 6. – С. 29-38 .

27. Шехтер, А. Б. Тканевая реакция на имплантацию различных материалов / А. Б. Шехтер // Биосовместимые материалы / В. И. Севастьянова. – М.: МИА, 2011. – С. 130-158.

28. Bader, A. Engineering of human vascular aortic tissue based on a xenogeneic starter matrix / A. Bader, G. Steinhoff, K. Strobl, T. Schilling, G. Brandes, H. Mertsching // Transplantation. – 2000. – № 70. – P. 7-14.

29. Badylak, S. F. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function/ S. F. Badylak, D. O. Freytes, T. W. Gilbert // Acta Biomaterialia. – 2009. – № 5. – P. 1-13.

30. Badylak, S. F. Immune response to biologic scaffold materials / S. F. Badylak, T. W. Gilbert // Semin Immunol. – 2008. – №20 (2). – P. 109-116.

31. Badylak, S. F. Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling / S. F. Badylak, J. E. Valentin, A. K. Ravindra, G. P. McCabe GP // Tissue Eng Part A. – 2008. – № 34. – P. 567- 577.

32. Badylak, S. F. The extracellular matrix as a biologic scaffold material / S. F. Badylak // Biomaterials. – 2007. – N.28. – P. 3587-3593.

33. Badylak, S.F. The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model / S. F. Badylak, R. Tullius, K. Kokini, K. D. Shelbourne, T. Klootwyk, S. L. Voytik // Biomed Mater Res. – 1995. – № 29 (8). – P. 977–985.

34. Brightman, A. O. Time-lapse confocal reflection microscopy of collagen fibrillogenesis and extracellular matrix assembly in vitro / A. O. Brightman, B. P. Rajwa, J. E. Sturgis, M. E. McCallister, J. P. Robinson, S. L. Voytik-Harbin // Biopolymers. – 2000. – №54 (3). – P. 222-234.

35. Brown, B. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix / B. Brown, K. Lindberg, J. Reing, D. B. Stolz, S. F. Badylak // Tissue Eng. – 2006. – № 12. – P. 519-526.

36. Cartmell, J. S. Effect of chemical treatment on tendon cellularity and mechanical properties / J. S. Cartmell, M. G. Dunn // *Biomed Mater Res.* – 2000. – № 49. – P. 134-140
37. Colbert, T. Decellularization of tissues and organs / T. Colbert, T. Sellaro, S. Badylak // *Biomaterials.* – 2006. – № 27(19). – P. 68-75.
38. Courtman, D. W. Biomechanical and ultrastructural comparison of cryopreservation and a novel cellular extraction of porcine aortic valve leaflets / D. W. Courtman, C. A. Pereira, S. Omar, S. E. Langdon, J. M. Lee, G. J. Wilson // *Biomed Mater Res.* – 1995. – № 29. – P. 1507-1516.
39. Curtil, A. Freeze drying of cardiac valves in preparation for cellular repopulation / A. Curtil, D. E. Pegg, A. Wilson // *Cryobiology.* – 1997. – № 34 (1). – P. 13-22.
40. Derwin, K. A. Commercial extracellular matrix scaffolds for rotator cuff tendon repair / K. A. Derwin, A. R. Baker, R. K. Spragg, D. R. Leigh, J. P. Iannotti // *Bone Joint Surg Am.* – 2006. – № 88 (12). – P. 65-72.
41. Devitt, C. A. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa / C. A. Devitt, G. M. Wildey, R. M. Cutrone // *Biomed Mater Res.* – 2003. – № 67 (2). – P. 637-640.
42. Freytes, D. O. Hydrated versus lyophilized forms of porcine extracellular matrix derived from the urinary bladder / D. O. Freytes, R. S. Tullius, J. E. Valentin, A. M. Stewart-Akers, S.F. Badylak // *Biomed Mater Res A.* – 2008. – № 80. – P. 234-240
43. Gilbert, T. W. Decellularization of tissues and organs / T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, S. F. Badylak // *Biomaterials.* – 2006. – № 27 (19). – P. 3675-3683.
44. Gilbert, T. W. Morphologic assessment of extracellular matrix scaffolds for patch tracheoplasty in a canine model / T. W. Gilbert, S. Gilbert, M. Madden, S. D. Reynolds, S. F. Badylak. Morphologic assessment of extracellular matrix scaffolds for patch tracheoplasty in a canine model // *Ann Thorac Surg.* – 2008. – № 86 (3). – P. 967-974.

45. Gilbert, T. W. Quantification of DNA in biologic scaffold materials / T. W. Gilbert, J. M. Freund, S. F. Badylak // *Surg Res.* – 2008. – № 54 (6). – P. 21-32.
46. Hafeez, Y. M. Effect of freeze-drying and gamma irradiation on biomechanical properties of bovine pericardium / Y. M. Hafeez, A. B. Zuki, N. Yusof, H. Asnah, M. Y. Loqman, M. M. Noordin // *Cell Tissue Bank.* – 2005. – № 6 (2). – P. 85-89.
47. Hodde, J. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture / J. Hodde, A. Janis, D. Ernst, D. Zopf, D. Sherman, C. Johnson // *J Mater Sci Mater Med.* – 2007. – Vol. 18. – P. 537–43.
48. Hodde, J. P. An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS Wound Matrix / J. P. Hodde, D. M. Ernst, M. C. Hiles // *Wound Care.* – 2005. – № 14 (1). – P. 23-25.
49. Hodde, J. P. Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix / J. P. Hodde, R. Record, R. Tullius, S. F. Badylak // *Biomaterials.* – 2002. – № 23 (8). – P.1841-1848.
50. Hodde, J. P. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix / J. P. Hodde, R. D. Record, H. A. Liang, S. F. Badylak // *Endothelium.* – 2001. – № 8 (1). – P. 11-24.
51. Hodde, J.P. Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement / J.P. Hodde, S.F. Badylak, A.O. Brightman, S.L. Voytik-Harbin // *Tissue Eng.* – 1996. – Vol.2, N.3. – 209-217.
52. Li, F. Low-molecularweight peptides derived from extracellular matrix as chemoattractants for primary endothelial cells / F. Li, W. Li, S. A. Johnson, D. A. Ingram, M. C. Yoder // *Endothelium.* – 2004. – № 11. – P. 199-206.
53. Lindberg, K. Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins / K. Lindberg, S. F. Badylak // *Burns.* – 2001. – № 27 (3). – P. 254-266.

54. McDevitt, C. A. Transforming growth factor-beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa / C. A. McDevitt, G. M. Wildey, R.M. Cutrone // *Biomed Mater Res A*. – 2003. – № 67. – P. 637-640.
55. Meyer, S. R. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat / S. R. Meyer, B. Chiu, T. A. Churchill, L. Zhu, J. R. Lakey, D. B. Ross // *Biomed Mater Res A*. – 2006. – №79. – P. 254-262.
56. Mulloy, B. Cytokines and proteoglycans: an introductory overview / B. Mulloy, C.C. Rider // *Biochem Soc Trans.* – 2006. –Vol. 34.– P. 409-413.
57. Murphy, C. M. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffoldsfor bone tissue engineering // C. M. Murph, M. G. Haugh, F. O’Brien // *Biomaterials*. – 2010.– № 3. – P. 461–466.
58. Neugebauer, J. M. Detergents: an overview / J. M. Neugebauer // *Methods Enzymol.* – 1990. – № 182. – P. 239-253.
59. Nihsen, E. S. Bioactivity of small intestinal submucosa and oxidized regenerated cellulose/collagen / E. S. Nihsen, C. E. Johnson, M. C. Hiles // *Adv Skin Wound Care*. – 2008. – № 21 (10). – P. 479-486.
60. Parenteau-Bareil, R. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications / R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod // *Materials*. – 2010. – № 3 (3). – P. 63-87.
61. Ratner, B. D. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine / B. D. Ratner – Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2004. – 355 p.
62. Rieder, E. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells / E. Rieder, M. T. Kasimir, G. Silberhumer, G. Seebacher, E. Wolner, P. Simon // *Thorac Cardiovasc Surg.* – 2004. – № 127. – P. 399-405.
63. Samouillan, V. Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve bioprotheses / V. Samouillan, J. Dandurand-Lods, A. Lamure, E.

Maurel, C. Lacabanne, G. Gerosa // Biomed Mater Res. – 1999. – № 46. – P. 55-87.

64. Schenke-Layland, K. Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study / K. Schenke-Layland, F. Opitz, M. Gross, C. Doring, K. J. Halbhuber, F. Schirrmeister // Cardiovasc Res. – 2003. – № 60. – P. 497-509.

65. Shekhter, A. B. Morphology of collagen matrices for tissue engineering (biocompatibility, biodegradation, tissue response) / A. B. Shekhter, A. E. Guller, L. P. Istranov, E. V. Istranova, D. V. Butnaru, A. Z. Vinarov, O. L. Zakharkina, A. V. Kurkov, D. F. Kantimerov, E. N. Antonov, L. V. Marisov, P. V. Glybochko // Arkh Patol. – 2015. – № 77 (6). – P. 29-38.

66. Shi, L. Biochemical and biomechanical characterization of porcine small intestinal submucosa (SIS): a mini review / L. Shi, V. Ronfard // Int J Burns Trauma. – 2013. – № 3(4). – P. 173-179.

67. Sicari, B. M. An Acellular Biologic Scaffold Promotes Skeletal Muscle Formation in Mice and Humans with Volumetric Muscle Loss / B. M. Sicari, J. P. Rubin, C. L. Dearth, M. T. Wolf, F. Ambrosio, M. Boninger, N. J. Turner, D. J. Weber, T. W. Simpson, A. Wyse, H. P. Brown, J. L. Dziki, L. E. Fisher, S. Brown, S. F. Badylak // Science Translational Medicine. – 2014. – № 6. – P. 479-486.

68. Valentin, J. E. Extracellular matrix bioscaffolds for orthopaedic applications. A comparative histologic study / J. E. Valentin, J. S. Badylak, G. P. McCabe, S. F. Badylak // Bone Joint Surg Am. – 2006. – № 88 (12). – P. 2673-2686.

69. Vesely, I. Heart valve tissue engineering / I. Vesely // Circ Res. – 2005. – № 97. – P. 743-755.

70. Vesely, I. The hybrid xenograft/autograft bioprosthetic heart valve: in vivo evaluation of tissue extraction / I. Vesely, R. Noseworthy, G. Pringle // Ann Thorac Surg. – 1995. – № 60. – P. 359-364.

71. Voytik-Harbin, S. L. Identification of extractable growth factors from small intestinesubmucosa / S. L. Voytik-Harbin, A. O. Brightman, M. R. Kraine, B. Waisner, S. F. Badylak // Cell Biochem. – 1997. – № 67 (4). – P. 478-491.
72. Wang, K. X. Effect of trypsin and Triton-X 100 for decellularization of porcine aortic heart valves / K. X. Wang, J. F. Zhang, Q. P. Zhan, X. H. Jian // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. – 2005. – № 25. – P. 22-25.
73. Woods, T. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft / T. Woods, P. F. Gratzer // Biomaterials. – 2005. – № 26 (35). – P. 7339-7349.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет физико–математических и
естественных наук

Кафедра «Общая биология и
биохимия»

Направление подготовки

06.04.01 Биология

Магистерская программа «Биохимия и
молекулярная биология»

Утверждаю

Зав. кафедрой



Г. А. Карпова

« 1 » декабря 2016 г.

Задание

По ВКР студента Коломыц Виктории Владимировны

Тема работы: «Разработка метода получения внеклеточного коллагенового
матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи и исследовании его
свойств»

Утверждена приказом по Университету от « 6 » декабря 2016 г. № 1192 а/о

Срок сдачи студентом законченной работы « 17 » мая 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Формулировка целей и задач магистерской диссертации, составление плана работы	Декабрь 2016	Выполнено
2.	Поиск и анализ научной литературы по теме «Разработка метода получения внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи и исследовании его свойств», изучение информации о видах внеклеточного коллагенового матрикса; о свойствах, особенностях и составе коллагеновых матриксов для тканевой регенерации	Декабрь 2016- март 2017	Выполнено
3.	Подбор и оформление библиографического списка	Март 2017	Выполнено
4.	Изучение различных методов обработки материала для получения внеклеточного коллагенового матрикса	Март- апрель 2017	Выполнено
5.	Изучение методов гистологической оценки тканевой реакции на имплантацию внеклеточного коллагенового матрикса	Апрель 2017	Выполнено
6.	Изучение методов определения физико-механических параметров внеклеточного коллагенового матрикса	Май 2017	Выполнено
7.	Изучение методов оценки тканевой реакции на имплантацию	Июнь- июль 2017	Выполнено
8.	Оформление первой и второй главы магистерской диссертации	Сентябрь- ноябрь 2017	Выполнено
9.	Подготовка экспериментальных образцов внеклеточного коллагенового матрикса на основе подслизистой тонкой кишки свиньи	Ноябрь 2017	Выполнено
10.	Проведение химико-ферментативной обработки биоматериала	Декабрь 2017	Выполнено
11.	Проведение гистологического контроля обработки биоматериала	Январь 2018	Выполнено
12.	Исследование физико-механических параметров полученного материала	Февраль 2018	Выполнено
13.	Проведение подкожной имплантации внеклеточного коллагенового матрикса	Февраль- март 2018	Выполнено

14.	Оценка результатов тканевой реакции на имплантацию внеклеточного матрикса	Март-апрель 2018	Выполнено
15.	Проведение исследований на цитотоксичность, митотическую активность, динамику численности клеточных популяций	Апрель 2018	Выполнено
16.	Проведение статистической обработки полученных результатов	Апрель-май 2018	Выполнено
17.	Оформление полученных результатов в виде таблиц, рисунков, диаграмм	Апрель-май 2018	Выполнено
18.	Подведение итогов и обработка результатов, полученных в ходе эксперимента	Май 2018	Выполнено
19.	Оформление третьей главы магистерской диссертации	Май 2018	Выполнено
20.	Подготовка презентации и доклада для защиты магистерской диссертации	Май 2018	Выполнено

Дата выдачи задания «01» 12 2016 г.

Руководитель
Венедиктов А.А., к.б.н.,
управляющий ООО «Кардиоплант»

Задание принял к исполнению
Коломыц В.В.